



# Analyse comparative, physiologique et moléculaire des effets de trois traitements masculinisants chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, et recherche de marqueurs de traçabilité liés à ces approches

Christian Ouedraogo

## ► To cite this version:

Christian Ouedraogo. Analyse comparative, physiologique et moléculaire des effets de trois traitements masculinisants chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, et recherche de marqueurs de traçabilité liés à ces approches. Biologie animale. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014. Français. NNT : 2014MON20048 . tel-01334575

**HAL Id: tel-01334575**

**<https://theses.hal.science/tel-01334575>**

Submitted on 21 Jun 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

## Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE

Et de l'unité de recherche UMR 110 INTREPID

Spécialité : **Ecosystèmes et sciences agronomiques**

Présentée par **Christian R. N. OUEDRAOGO**

**Analyse comparative, physiologique et moléculaire  
des effets de trois traitements masculinisants chez le  
tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, et recherche de  
marqueurs de traçabilité liés à ces approches**

Soutenue le 24/07/2014 devant le jury composé de

M. Charles MELARD, Professeur, Université de Liège	Rapporteur
M. Alexis FOSTIER, Docteur, INRA Rennes	Rapporteur
Mme. Marina GOVOROUN, Docteur, INRA Tours	Examinatrice
M. Jehan Hervé LIGNOT, Professeur, Université Montpellier 2	Examineur
M. Jean-François BAROILLER, Docteur, CIRAD	Directeur de thèse

*Je puis tout par celui qui me fortifie.*

*Philippiens 4 :13*

*A mon épouse Rebecca*





## Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux nombreuses personnes qui ont contribué à rendre ce travail de recherche possible.

Je voudrais commencer par remercier Jean-François Baroiller mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli, formé, orienté et guidé tout au long de cette thèse. C'est un honneur de m'inscrire dans la liste des étudiants qui sont passés entre tes mains. Merci de m'avoir fait confiance en me laissant l'autonomie nécessaire pour réaliser ce projet auquel je tenais tant. Ce projet né au bord d'un étang dans une station d'aquaculture au Burkina et pour lequel j'ai dû attendre deux longues années. Merci de m'avoir permis de voyager et de prendre part à des congrès internationaux de hauts niveaux scientifiques dans mon domaine, et de m'avoir permis de rencontrer de nombreux chercheurs reconnus pour leurs contributions dans notre domaine d'expertise.

Je tiens tout particulièrement à remercier Hélène D'Cotta pour son encadrement, les nouveaux outils que j'ai acquis sous sa houlette. Moi qui me sentais si limité sans la « biomol » et maintenant je sais rechercher, suivre et surveiller l'expression d'un gène ! Et mieux, la présente thèse propose des scénarii de profils d'expression. Merci infiniment. Merci pour ta patience. Je tiens à te dire merci de tout cœur pour les couverts que tu as mis à ma disposition dès mon arrivée jusqu'à la fin de mon séjour. J'en ai été très touché.

Un énorme merci à Etienne Baras pour m'avoir guidé, épaulé et soutenu pendant ces longues années, même pendant les weekends et surtout avec l'aide de Dominique Caseau-Baras à qui je dis toute ma gratitude pour ses relectures et corrections en anglais et même pour être venue travailler avec Etienne et moi en weekend à peser mes précieux poissons. Merci beaucoup.

Je remercie Marie-Laure Bégout et Xavier Cousin pour leur formation au marquage des poissons, et la prise en main du lecteur de RFID et du logiciel d'utilisation, mais aussi pour leurs conseils sur le comportement des poissons.

Un grand merci à Béatrice Chatain pour ses précieux conseils et son soutien. Tes formations en statistiques m'ont permis une mise à jour et une meilleure anticipation sur les protocoles.

J'exprime ici ma profonde gratitude aux membres du jury qui ont évalué ce travail. Les conseils et commentaires des rapporteurs Alexis Fostier et Charles Mélard permettront

d'améliorer le manuscrit. Merci aux examinateurs Marina Govoroun et Jehan Hervé Lignot de me faire profiter de leur expérience et conseils.

Je suis très reconnaissant de l'aide, des conseils et de l'amitié dont j'ai bénéficié dans mon laboratoire d'accueil INTREPID (Intensification Raisonnée et Ecologique pour une Pisciculture Durable) :

Sur le site de Baillarguet et de Lavalette, j'ai pu m'appuyer et profiter de la compétence d'Elodie Pepey et de Marc Canonne. Merci pour votre amitié et votre présence.

Je suis très reconnaissant à Brigitte Bournier qui m'a facilité la tâche pour tout ce qui est administratif et même personnellement en me maternant, et en veillant à ce que tout se passe pour le mieux tant au travail que sur le plan privé.

Je remercie Olivier Mikolasek pour son soutien et son amitié. Dès les premiers jours j'ai pu avoir des conseils et des orientations qui m'ont été utiles pour le reste de mon séjour en France. Merci de m'avoir invité dans ta belle maison et fait découvrir les beaux paysages des environs.

Merci également à Marie-Raphaëlle Almin, Lucile Soler « co-thésardes » et maintenant amies pour leur soutien, l'aide à la garderie des poissons, au prélèvement d'organes etc. Vous m'avez permis de très vite avoir des repères dans Montpellier.

Je remercie Samira qui avec Hélène m'ont initié à des techniques de labo qui m'ont servi tout au long de ma thèse.

Je remercie Frédéric Clota, Brigitte Sauret pour leur aide à la serre et leurs encouragements.

Je remercie Denis Bastianelli, Laurent Bonnal, Elodie Baby, Martine Azzopardi pour leur disponibilité, leur soutien et l'accès à leurs installations pour mes manip. Je remercie également Anne Geiger et Iliassou pour leur soutien.

Je ne saurais citer ici tous les noms, au risque d'en oublier, de tous mes co-équipiers de Volleyball à Baillarguet avec qui j'ai passé d'agréables pauses et développer de réelles amitiés. C'était un excellent tremplin pour me rencontrer et échanger avec des chercheurs de différents domaines et équipes.

Sur le site de Palavas j'ai, à de multiples reprises, pu compter sur la disponibilité et les conseils de beaucoup de personnes. Je veux remercier ici Alain Vergnet, Philippe Cacot, Julie

Colleter, Myriam Callier et Lionel Dabbadie qui spontanément répondaient favorablement à mes sollicitations, me transmettant parfois même pendant les weekends du matériel de marquage de poissons. Grand merci.

Je remercie vivement « l'équipe IRD » : Marc Legendre, Jacques, Rémi Dugue, Christophe Cochet, pour les disponibilité à répondre à mes sollicitations : prise en main des logiciels d'analyse et de traitement d'images, de logiciels de traitement de données, des astreintes pour veiller sur mes précieux poissons, et de bien indispensables conseils de Marc Legendre pendant les reproductions artificielles. Merci infiniment.

Je remercie vivement Hugues De Verdal pour ses conseils et analyses de données, ses encouragements et son amitié. Malgré la distance de ton lieu d'affectation et le décalage horaire, tu étais toujours présent et c'était un plaisir de rédiger les articles que nous avons écrits.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux stagiaires qui sont passés dans l'équipe pendant mon stage et qui n'ont jamais hésité à s'investir à mes côtés pour aider et apprendre aussi. Je veux remercier, Cédric Genieys, Nina Meilisza and Clémence Ménard Cédric pour leur aide pendant les manip de marquage à la serre. Je remercie Léa Monnier, Arnaud Gagnieu, Elia Ciani et Andreas Pessina pour les aides pendant les échantillonnages et la surveillance des aquariums.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Michele et Michel Barra, leurs filles Alice et Emilie Barra, Jérôme Antunes et l'adorable petite Emma et enfin Samuel Recouli pour leur amitié, leur soutien et leurs encouragements. J'ai trouvé chez vous ici en France l'accueil, l'affection et l'assistance de tous les instants comme un membre à part entière de votre famille. Merci du fond du cœur, je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi et ma douce épouse Rébécca.

Je remercie tout particulièrement Alice Barra pour les belles illustrations des chapitres et parties de cette thèse.

Je remercie la famille Meunier et conjoints pour leurs encouragements : Alain, Jacqueline, Caroline, Sandra, Arnaud, Hervé, Anthony.

Grand merci à mes amis pour leur soutien et encouragements : Anthony Fadat, Rémi Phan, Fabien Pinard, Fabien et Odile, Forest Finbow, Ludivine et Eddy, Nicolas et Aurore, Cécilia

et Jef, Claire, Isabelle et François Rixte ; Samuel et Marion Rixte, Elodie Rixte, les membres de mes clubs de volleyball à Clapiers et au VLM. Vous avez contribué à rendre mon séjour plus agréable. Merci également de m'avoir introduit dans vos cercles d'amis, j'y ai trouvé de bons amis.

J'ai bénéficié d'une bourse de la coopération française pour entreprendre cette thèse. Sans cela, cette thèse n'aurait pas été possible. J'exprime ma vive reconnaissance et ma gratitude à l'ambassade de France au Burkina Faso pour avoir investi pour l'avenir et pour tout ce qu'elle fait pour la formation des étudiants burkinabè.

Il est opportun de rappeler ici que cette thèse n'aurait pas eu lieu sans la confiance, l'amitié et l'aide de François Gaudeau qui n'a pas hésité à mettre tout en œuvre, humainement et financièrement, pour la réalisation de ce projet. Merci infiniment.

Je suis très reconnaissant au professeur Gouro Abdoulaye alors du Directeur Général du CIRDES (Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide) qui, de ses propres mots, en tant président de mon jury de DEA a été si satisfait de la qualité de mon travail qu'il n'a pas hésité à décrocher son téléphone pour appeler mon directeur de thèse et me recommander chaleureusement. Je voudrais exprimer ici toute ma gratitude pour votre présence et vos efforts chaque fois que vous veniez en France pour venir jusqu'à Montpellier me rencontrer et vous enquérir de l'évolution de ma thèse. Merci beaucoup pour vos précieux conseils.

Je remercie très affectueusement mes parents, mes frères et sœurs qui m'ont toujours soutenu et poussé à aller de l'avant.

Je finirai par dire un grand merci à mon épouse Rebecca qui a su me supporter, me soutenir et me reconforter. Merci infiniment.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE .....	2
CHAPITRE 1 .....	33
Production du matériel biologique recherché : Synchronisation des femelles et plans de croisements .....	33
CHAPITRE 2 .....	42
1 <sup>ère</sup> partie : .....	42
Micro-tagging of Nile tilapia with Small Electronic Tags and Estimation of Body Weight by Image Analysis .....	42
2 <sup>ème</sup> Partie : .....	59
Minimal body size for tagging fish with electronic microchips: a study in the Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	59
CHAPITRE 3 .....	72
Growth and survival of XX Nile tilapia masculinised with elevated temperature, 17 $\alpha$ -methyltestosterone and fadrozole in comparison to XX females and XY males.....	72
CHAPITRE 4 .....	85
Brain masculinisation shows different <i>cyp19a1B</i> and <i>amh</i> expression profiles between genetic XY males, 17 $\alpha$ -methyltestosterone, temperature and fadrozole-induced XX males of tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> ..	85
CHAPITRE 5 .....	104
Different masculinising treatments of XX tilapia all induce the increase of <i>dmrt1</i> and <i>amh</i> to suppress the ovarian pathway.....	104
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	131

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. SCHEMA DE PRODUCTION DE MALES ET FEMELLES YY POUR UNE PRODUCTION GENETIQUE DE POPULATIONS MONOSEXES MALES .....	17
FIGURE 2. PRODUCTION DE MALES YY PAR ANDROGENESE .....	18
FIGURE 3. SCHEMA DE REGULATION DES GENES DANS LES GONADES DE TILAPIA DU NIL FEMELLES XX (ROSE) MALES XY (BLEU) ET DES MALES INDUITS PAR DE FORTES TEMPERATURES XX (VERT). (BAROILLER ET AL., 2009A). .....	23
Liste des tableaux	

TABLEAU 1. PRESENTATION DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES METHODES DE PRODUCTION DE MONOSEXES MALES DE TILAPIA. DONNEES COMPLETEES DE BEARDMORE ET AL. (2001), BAROILLER ET AL. (2009A), KWON ET AL. (2000) ET SINGH ET AL. (2012).....	13
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

# Introduction Générale



## INTRODUCTION GENERALE

Chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, la production de populations monosexes mâles est un enjeu important pour la rentabilité des élevages (Baroiller et al., 2009a; Singh, 2013). En effet, chez les espèces du genre *Oreochromis* où l'incubation buccale est strictement femelle (Trewavas, 1983), l'utilisation en élevage de populations exclusivement mâles permet a) de bénéficier de la meilleure croissance des mâles (Mélard et al., 1989; Beardmore et al., 2001) et b) d'empêcher toute reproduction spontanée chez cette espèce à maturité sexuelle précoce (5-6 mois) dont le cycle est continu (mensuel) et asynchrone entre les femelles ; en l'absence d'un tel contrôle, on observe alors, en milieu fermé (étangs, bacs...), une prolifération en alevins et juvéniles qui se traduit par une réduction de la croissance globale de la population (Baroiller et al., 2009; Singh, 2013).

Plusieurs méthodes ont été développées pour produire des populations monosexes mâles chez les tilapias (Baroiller et al., 2009a; Cnaani & Levavi-Sivan, 2009; Lozano et al., 2013). Mais c'est l'inversion hormonale par des androgènes qui reste actuellement l'approche la plus pratiquée dans les 135 pays et territoires qui produisent du tilapia sur tous les continents (FAO, 2014). L'utilisation de mâles YY (revues de Baroiller et al., 2009a; Singh, 2013) est bien moins répandue, et les autres méthodes (sexage manuel, hybrides, fortes températures) restent encore très marginales. Selon une enquête récente (Baroiller, D'Cotta et Thomé, données non publiées), 5% des producteurs seulement utilisent les mâles YY (coût élevé, complexité de gestion de ces géniteurs non disponibles pour beaucoup de souches d'élevage), tandis que 95% d'entre eux privilégient l'inversion hormonale. Toutefois, l'utilisation des androgènes pour la production directe de poissons marchands soulève de nombreuses questions relevant de la sécurité sanitaire des aliments, des risques potentiels pour les ouvriers aquacoles, et de l'impact des résidus des traitements sur l'environnement (qualité de l'eau et biodiversité). C'est pourquoi un nombre croissant de pays n'autorise pas ou déconseille l'utilisation de tels traitements pour la production directe de poissons de consommation. Le développement d'approches non hormonales pour un contrôle du sexe respectant le consommateur et l'environnement nécessite d'abord une meilleure connaissance du déterminisme et de la différenciation du sexe chez les poissons et en particulier chez les tilapias.



Chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, le déterminisme du sexe repose principalement sur une hétérogamétie mâle XX / XY comme chez les mammifères, mais des facteurs génétiques mineurs et la température de l'eau peuvent aussi influencer les sex-ratios (revues de Cnaani et al., 2008; Baroiller et al., 2009); trois groupes de liaison LG1, LG3 et LG23 (LG = Linkage Group) sont ainsi associés au sexe (Cnaani, 2013).

Néanmoins, on ne connaît pas encore le(s) déterminant(s) majeur(s) et mineurs chez les tilapias. En revanche, chez les poissons comme chez les vertébrés non mammaliens, il est maintenant bien établi que les œstrogènes jouent un rôle majeur dans la différenciation du sexe (Guiguen et al., 1999; D'Cotta et al., 2001a). L'aromatase est une enzyme qui permet la transformation des androgènes en œstrogènes chez tous les vertébrés, des mammifères aux poissons. Si l'on excepte l'anguille japonaise (Jeng et al., 2012), deux gènes de l'aromatase sont présents chez les poissons: *Cyp19a1a* ou P450aromA est principalement exprimée dans les gonades, tandis que *cyp19a1b* ou P450aromB est préférentiellement exprimée dans le cerveau (Callard et al., 2001, Kwon et al., 2001; Chang et al., 2005; Cheshenko et al., 2008), sauf chez certains cichlidés (Böhne et al., 2013). Une faible expression du gène de l'aromatase gonadique (*cyp19a1a*) est associée à une différenciation testiculaire, tandis que chez les futures femelles, le niveau d'expression est au contraire élevé (D'Cotta et al., 2001a; Esterhuyse et al., 2008). Enfin, l'inhibition de l'activité de cette enzyme ou de l'expression de son gène par des traitements utilisant des androgènes, des inhibiteurs (qu'ils soient stéroïdiens ou non) de l'aromatase ou des fortes températures conduit à une masculinisation fonctionnelle chez les tilapias (D'Cotta et al., 2001a; Baroiller et D'Cotta., 2001; Baroiller et al., 2009a, b). De fait, les effets masculinisants des traitements par des androgènes semblent reposer non seulement sur une inhibition de l'expression de l'aromatase (Bhandari et al., 2006), une diminution de l'activité enzymatique de l'aromatase gonadique, mais aussi sur l'activité androgénique propre de ces androgènes (Golan et Levavi-Sivan, 2014).

Chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* l'inversion fonctionnelle des gonades par inhibition de la synthèse des œstrogènes endogènes est associée à un profil d'expressions géniques très similaire à celui d'un testicule chez un mâle génétique (Vizziano et al., 2008). Tout traitement réduisant la synthèse des œstrogènes conduit donc à une masculinisation fonctionnelle chez les poissons, en particulier chez les tilapias. Par ailleurs, des traitements avec le tamoxifène, inhibiteur compétitif de la liaison œstrogènes-récepteurs, entraînent des réductions de l'expression de *cyp19a1a* (Kitano et al., 2007; Liu et al., 2007), suggérant une régulation directe ou indirecte du gène de l'aromatase gonadique par les œstrogènes et soutenant l'hypothèse qu'ils sont les initiateurs de la différenciation ovarienne chez le tilapia du Nil (Kobayashi et al., 2003).

Dès lors qu'il existe différentes techniques possibles permettant la production d'un phénotype mâle, on peut s'interroger sur les performances zootechniques relatives de ces individus selon les méthodes d'obtention, mais aussi sur la possibilité de développer des marqueurs permettant une traçabilité des approches mises en œuvre pour le contrôle du sexe.

Le présent travail a d'abord consisté à comparer l'efficacité de 3 approches de masculinisation, chez des alevins de tilapia du Nil, ainsi que leurs effets respectifs sur des caractères d'intérêt zootechnique comme la survie et la croissance. Parallèlement, la physiologie de ces trois types de mâles (mâles 17MT, mâles anti-aromatase et thermo-mâles) a été comparée à celle de mâles génétiques XY par des approches moléculaires, au niveau des gonades mais aussi du cerveau en se focalisant sur des gènes connus pour être affectés par une modulation de l'expression du gène de l'aromatase (Baroiller et al., 2009a, b; Berishvili et al., 2006, 2010; Shved et al., 2007, 2008, 2009; Baroiller et al., 2014). Enfin, sur la base de l'analyse d'expression de ces gènes, de possibles marqueurs permettant de discriminer des mâles produits par les différentes approches ont été recherchés.

Le présent manuscrit s'organise comme suit :

La première partie présente l'état de l'art des connaissances sur le déterminisme et la différenciation du sexe chez les poissons, ainsi que la biologie, l'aquaculture du tilapia du Nil et les techniques de contrôle du sexe utilisées dans cette filière. Ensuite une présentation des principales données concernant le rôle de quelques gènes importants de la différenciation sexuelle chez les vertébrés et leurs profils d'expression chez les téléostéens permet de faire l'état des connaissances de la régulation de ces gènes à ce jour.

Le chapitre 1 (Ouedraogo et al., 2014) expose les méthodes de production du matériel biologique, des conditions d'élevage et présente deux articles de méthodologie dont le premier présenté en 1<sup>ère</sup> partie est une étude de faisabilité (Ouedraogo et al., Proceedings ISTA 10) du marquage précoce du tilapia du Nil avec des RFID-tags et des small PIT-tags et dont les résultats ont inspiré, en 2<sup>ème</sup> partie la production du second article sur le marquage précoce du tilapia et a permis d'estimer la taille minimale de marquage du tilapia avec des RFID ou des small PIT-tags (Ouedraogo et al., 2014; North American Journal of Aquaculture).

Le chapitre 3 (Ouedraogo et al., soumis), qui s'est inspiré du chapitre 1 du point de vue de l'utilisation des conclusions nées des résultats du chapitre 1, évalue les performances de croissance dans les 5 lots de traitement en condition de compétition. Il s'agit de marquer individuellement les poissons issus des différents traitements et ensuite de regrouper dans un

seul bac d'élevage puis de suivre les performances de croissance de chaque individu et dans chaque groupe de traitement. Ceci a permis de comparer les performances des mâles induits à celui des mâles et des femelles génétiques.

Au chapitre 4 (Ouedraogo et al., soumis) sont décrits les profils d'expression de l'aromatase (*cyp19a1b*) et de l'*amh* dans le cerveau ainsi que l'expression des récepteurs des œstrogènes chez les mâles induits par rapport aux expressions chez les femelles et les mâles génétiques à 14 jpf, 31 jpf et à un stade pré-mature.

Le chapitre 5 (Ouedraogo et al., soumis) donne le patron d'expression de l'*amh*, de l'aromatase (*cyp19a1a*), de *foxl2*, de *dmrt1* dans la gonade chez les mâles induits par rapport aux expressions chez les femelles et les mâles génétiques à 14 jpf, 31 jpf et à un stade pré-mature de 110 jpf.

Enfin, à la lumière des résultats obtenus nous tirons la conclusion générale et discutons les perspectives qui se sont dégagées à l'issue des travaux réalisés.

#### 1. Modes de reproduction, déterminisme et différenciation du sexe chez les poissons

Trois principaux modes de reproduction peuvent être rencontrés chez les poissons (Baroiller et al., 1999):

- le gonochorisme qui est le plus répandu, caractérise les espèces chez lesquelles les géniteurs sont soit mâles soit femelles et qui conservent ce sexe toute leur vie;
- l'unisexualité a été mise en évidence chez quelques rares espèces, pour lesquelles il existe des populations constituées exclusivement de femelles, qui font appel à des mâles d'espèces proches, pour déclencher un développement embryonnaire de leurs œufs sans caryogamie ou avec une expulsion partielle ou totale du génome paternel. La diploïdie nécessaire à la viabilité de l'embryon est ensuite restaurée par gynogenèse; l'hermaphrodisme caractérise des espèces chez lesquelles une partie au moins des individus produiront les deux types de gamètes successivement ou simultanément.
- L'hermaphrodisme lorsque les deux sexes peuvent être rencontrés chez le même individu.

## 1.1. Déterminisme et différenciation du sexe

En amont d'une cascade de gènes bien conservés chez les vertébrés mais dont la place et le rôle respectifs peuvent varier selon les classes et même selon les espèces, le déterminisme du sexe, qui peut être génétique, environnemental ou mixte (génétique et environnemental) va imposer le sexe futur d'un individu. La différenciation du sexe correspond au développement d'ovaires ou de testicules à partir d'une gonade indifférenciée ou bipotente (revue de Baroiller et al., 1999).

### 1.1.1. Déterminisme du sexe

Chez les vertébrés, on peut distinguer trois principaux modèles de déterminisme du sexe (Adkins-Regan et Reeve, 2014 ; Nakamura, 2010):

- un déterminisme génétique (GSD = Genetic Sex Determination) qui repose strictement sur des facteurs génétiques,
- un déterminisme environnemental qui est exclusivement piloté par des facteurs environnementaux (ESD = Environmental Sex Determination),
- un modèle mixte (Shine et al., 2002 ; Sarre et al., 2004 ; Bull, 2008 ; Warner and Shine, 2008 ; Baroiller et al., 2009 ; Quinn et al., 2009; Grossen et al., 2010) dans lequel coexistent les deux premiers systèmes (GSD et ESD).

Ainsi les mammifères, dans leur très grande majorité, présentent un déterminisme stable et homogène, strictement génétique (GSD), gouverné par une paire de chromosomes sexuels, le déterminant majeur étant porté par le chromosome Y. Dans ce système monogénique, le sexe mâle est hétérogamétique (XY), et la femelle homogamétique XX.

De la même manière, chez les oiseaux, le déterminisme est stable et homogène, toujours strictement génétique (GSD) mais l'hétérogamétie est femelle (ZW). Chez les amphibiens, le déterminisme du sexe est hétérogène ; en effet, on retrouve les deux types de GSD, certaines espèces possédant une hétérogamétie mâle comme chez les mammifères (XX/XY) et d'autres une homogamétie mâle de type oiseaux (ZZ/ZW) ; par ailleurs, chez beaucoup d'espèces

d'amphibiens, les températures induisent souvent des déviations de sexe-ratios. Ces effets de l'environnement, longtemps considérés comme extra-physiologiques, ont été récemment mis en évidence dans différentes populations naturelles de grenouilles, présentant un gradient de déterminismes allant d'une GSD pure à un déterminisme environnemental, en passant par tous les degrés de co-existence de ces deux systèmes (Perrin et al., com. pers.).

Chez les reptiles, tous les serpents possèdent une GSD avec hétérogamétie femelle (ZW), tandis que les lézards et quelques tortues, ont un déterminisme génétique de type oiseaux (homogamétie mâle, ZZ), ou de type mammifères (hétérogamétie mâle XY). Chez tous les crocodiles, la plupart des tortues, quelques lézards et les deux espèces de *Sphenodon*, c'est l'environnement qui détermine le sexe (ESD) et plus particulièrement la température (TSD = Temperature Sex Determination). Chez deux espèces de lézard, GSD et TSD cohabitent (Shine et al., 2002 ; Radder et al., 2008 ; Quinn et al., 2007), Chez ces deux espèces, la GSD gouverne alors le sexe à des températures moyennes, tandis que la température prend le relais pour des valeurs extrêmes; avec démonstration du rôle adaptatif de cette TSD.

Enfin, chez les poissons, le déterminisme du sexe présente une impressionnante diversité puisque de nombreuses formes de GSD, ESD/TSD, et GSD-TSD sont rapportées (Baroiller et al., 1999 ; Baroiller et al., 2009a, b ; Heule et al., 2014). La GSD peut prendre de nombreuses formes et impliquer un (systèmes de type X0), deux (systèmes de type monogénique avec homogamétie mâle, ZZ/ZW, ou femelle ,XX/XY) ou même trois chromosomes sexuels (X, Y W), ou reposer à la fois sur des facteurs génétiques majeurs (chromosomes sexuels) et mineurs (portés par des autosomes), ou enfin des systèmes polygéniques sans chromosomes sexuels. L'ESD est très majoritairement représentée par des TSD. Des transitions entre GSD et TSD peuvent être observées à l'échelle des populations d'une même espèce, comme chez la capucette, *Menidia menidia*. En effet, chez cette espèce, on observe un gradient de thermosensibilité selon les populations, qui vont d'une absence de TSD (GSD pure) à une absence de GSD (TSD pure). Dans un tel gradient, TSD et GSD peuvent donc cohabiter. Chez le tilapia, la GSD contrôle le sexe dans des gammes de régimes thermiques optimum, tandis que les fortes températures masculinisent les descendance thermosensibles (Baroiller et al., 2009a).

### 1.1.1. Différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle chez les poissons peut suivre deux voies possibles: dans un premier cas, tous les individus vont commencer à se différencier vers le sexe femelle, puis chez la moitié d'entre eux, la gonade va évoluer vers un testicule après dégénérescence des ovocytes. Les espèces qui suivent cette voie sont dites « espèces indifférenciées » (Yamamoto, 1969). C'est le cas du poisson-zèbre (Takahashi, 1977 ; Orban et al., 2009) et du barbu de Sumatra, *Barbus tetrazona tetrazona* (Takahashi et Shimizu, 1983). Au contraire, chez la très grande majorité des espèces, dites alors différenciées, les cellules gonadiques primordiales se différencient directement soit en ovaire soit en testicule. Chez ces espèces différenciées, les premières différences histologiques liées à la différenciation sexuelle sont d'abord visibles chez les femelles puis chez les mâles et se traduisent par un nombre de cellules germinales qui augmente fortement chez les femelles et beaucoup plus progressivement chez les mâles comme rapporté par exemple chez la truite, le tilapia, la morue et bien d'autres espèces (Baroiller, 1988 ; Nakamura et al., 1998; D'Cotta et al., 2001a ; Lebrun et al., 2002; Strüssmann et al., 2002; Lewis et al., 2008 ; Baroiller et al., 2009a ; Kobayashi et al., 2009). C'est ensuite dans les gonades riches en cellules germinales qu'interviendront les premières méïoses. Parallèlement à ces événements qui touchent les cellules germinales, la gonade va se structurer notamment pour former la future cavité ovarienne dans les gonades femelles et les futurs canaux efférents puis la configuration lobulaire chez les individus mâles (Nakamura et al., 1998; D'Cotta et al., 2001b; Devlin et Nagahama, 2002 ; Strüssmann et al., 2002).).

L'apparition de vaisseaux sanguins semble également plus précoce dans les futures gonades femelles que dans les mâles ; au voisinage de ces vaisseaux, se mettront en place les premières cellules stéroïdogènes, également plus précoces chez les femelles que chez les mâles (Nakamura, 2013).

La connaissance de la nature des inducteurs de la différenciation sexuelle est d'une importance capitale pour l'efficacité du contrôle du sexe. Chez les mammifères, les hormones stéroïdiennes sont divisées en quatre grands groupes sur la base de leur structure et de leur fonction physiologique: les androgènes, les œstrogènes, les progestagènes et les corticostéroïdes. Des représentants des quatre groupes ont été identifiés chez les poissons (Fostier et al., 1983) et plus particulièrement pendant la période de différenciation sexuelle chez le tilapia du Nil (Baroiller, 1988 ; Baroiller et al., 1988). Les stéroïdes sexuels sont

principalement impliqués dans la régulation de la différenciation du sexe, de la gamétogenèse, et de la reproduction. Concernant la différenciation du sexe, dès 1969, Yamamoto avait suggéré que les stéroïdes sexuels pouvaient être les inducteurs naturels du sexe. Ainsi des enzymes stéroïdogéniques ont été identifiées avant ou pendant la période de différenciation sexuelle chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Van den Hurk et al., 1982 ; Antila 1984 ; Feist & Schreck, 1996) et chez *Oreochromis niloticus* (Hines et al., 1999). Les stéroïdes sexuels agissent à travers des récepteurs spécifiques sur des cellules cibles. Les récepteurs des androgènes et des œstrogènes ont été caractérisés chez plusieurs espèces de poissons (Schleicher et al., 1984; Cooke et al., 1991 ; Fitzpatrick et al., 1994 ; Kah et al., 1997; Chang et al., 1999; Todo et al., 1999), dont le tilapia du Nil (Chakraborty et al., 2013). Selon Adkins-Regan (1981), les stéroïdes sexuels agissent, pendant la période de différenciation sexuelle, comme des facteurs morphogéniques et plus tard pendant la maturation sexuelle, comme des facteurs activateurs.

Chez les poissons téléostéens, il existe une période critique qui précède la différenciation morphologique du sexe. Des traitements stéroïdiens appliqués pendant cette période et couvrant le début de la différenciation histologique du sexe permettent de masculiniser (androgènes) ou féminiser (œstrogènes) les animaux traités. Par ailleurs, la mise en évidence de cellules stéroïdogènes actives dans cette même période précédant la différenciation, d'abord par des approches ultrastructurales ou histochimiques, puis par des analyses d'expression des enzymes de la stéroïdogénèse (revues de Baroiller et al., 1999; Guiguen et al., 1999; D'Cotta et al., 2001b; Devlin et Nagahama, 2002), ainsi que la présence de forts niveaux d'oestradiol chez les femelles et de faibles niveaux chez les mâles, suggéraient fortement l'implication des stéroïdes endogènes dans la différenciation du sexe chez les poissons. De nombreux travaux ont ensuite démontré le rôle majeur des œstrogènes et du gène de l'aromatase (enzyme nécessaire pour la production des œstrogènes) dans la différenciation ovarienne des poissons (Guiguen et al., 1999 ; D'Cotta et al., 2001a ; Guiguen et al., 2010) : la suppression de l'expression de *cyp19a1a*, l'inhibition de l'activité enzymatique de l'aromatase ou le blocage des voies de signalisation des œstrogènes conduisent en effet à une masculinisation fonctionnelle (Guiguen et al., 2010). Une stimulation de l'expression de *cyp19a1a* est donc nécessaire à la mise en place et au maintien de la différenciation ovarienne, tandis que son inhibition suffit à induire une différenciation testiculaire (Guiguen et al., 2010).

## 1.2. Biologie et aquaculture du Tilapia du Nil: le besoin d'un contrôle du sexe

Les tilapias constituent la sous-famille des Tilapiinae, appartenant à la famille des *Cichlidae* et à l'ordre des Perciformes dont les particularités les plus apparentes sont entre autres une ligne latérale discontinue. Selon Lévêque et Paugy (1984), les Cichlidés sont de plus caractérisés par :

- un corps couvert d'écailles imbriquées ;
- des nageoires pelviennes rapprochées des pectorales et situées au-dessus de ces dernières ;
- une seule nageoire dorsale à rayons antérieurs épineux ;
- trois épines à la nageoire anale ;
- une seule narine de chaque côté.

Cette famille comprend quatre genres, regroupés sous le nom courant de tilapia (Trewavas, 1983) :

- le genre *Tilapia*, constitué de pondeurs sur substrat ;
- le genre *Sarotherodon*, constitué d'incubateurs buccaux chez lesquels la garde de la progéniture peut être assurée par les deux parents, mais l'est surtout par le mâle. Le dimorphisme sexuel de croissance est peu marqué ;
- le genre *Oreochromis*, composé d'incubateurs buccaux exclusivement maternels. Chez ces espèces, le dimorphisme sexuel de croissance est très marqué, en faveur des mâles ;
- le genre *Danakila*, genre monospécifique de faible importance économique.

Les tilapias se sont adaptés à des environnements variés et peuvent vivre à des températures comprises entre 9°C et 40°C. Certaines populations des espèces *O. niloticus* et *O. mossambicus* supportent jusqu'à 41°C (Denzer, 1968; Allanson & Noble, 1984). Au contraire, beaucoup cessent de s'alimenter dès que la température est inférieure à 16°C, ou ne peuvent se reproduire quand les températures sont inférieures à 22°C. Les meilleures performances de croissance sont observées à des températures allant de 28°C à 31°C (Denzer, 1968).

Les tilapias se montrent particulièrement résistants aux conditions hypoxiques (Mélard et Philippart, 1981). Toutes les espèces pourraient survivre à un taux d'oxygène dissous de 1



mg/l mais cesseraient de s'alimenter quand ce taux descend en-dessous de 1,5 mg/l (Allison et al., 1976). L'adaptation à la salinité diffère selon les espèces. Ainsi, certaines espèces comme *T. guineensis*, ou *O. mossambicus* sont euryhalines (Wokoma & Marioghae, 1996), voire hyper-euryhalines dans le cas de *Sarotherodon melanotheron* qu'on peut rencontrer dans des eaux hyper-salées (jusqu'à 130 ppm) du Saloum au Sénégal. Inversement, *O. niloticus*, présente une plus faible euryhalinité et ne peut survivre en eau de mer. Les tilapias présentent également une forte tolérance aux variations de pH. Le pH optimal pour ces espèces est généralement compris entre 7 et 8, mais certaines espèces ou populations se sont adaptées aux pH très acides des eaux noires des forêts tropicales (Varadaraj et al., 1994). Mais l'espèce qui présente sans doute les plus impressionnantes capacités d'adaptation à des environnements difficiles est le tilapia du Lac Magadi au Kenya (*Alcolapia grahami*), qui est confronté à une osmolalité de 600 mOs/mL, une alcalinité de 380 mmol/L, un pH de 10, et des températures allant jusqu'à 42°C.

Le mode alimentaire est caractéristique du genre. Ainsi, les poissons du genre *Tilapia* sont d'abord zooplanctonophages puis deviennent omnivores (Bard et al., 1974). Les poissons des genres *Sarotherodon* et *Oreochromis* consomment essentiellement du phytoplancton et des macro-détritus divers (Bard et al., 1974). Les tilapias sont extrêmement résistants aux maladies en contexte d'élevage. En revanche, ils sont le plus souvent porteurs sains de plusieurs virus (Shoemaker et al., 2000; Xu et al., 2007).

En milieu naturel, la reproduction se caractérise par un comportement parental visant à protéger les œufs dès la fécondation. Les sites de frai sont généralement localisés dans des zones de faible profondeur, de préférence à substrat sablonneux (Philippart & Ruwet, 1982). Les Tilapias pondeurs sur substrat forment des couples stables et défendent un territoire pendant le frai. Les deux parents creusent un trou pour préparer un nid où les œufs sont déposés, puis fécondés. Ensuite, ils surveillent les œufs et les ventilent à l'aide de leurs nageoires. Après éclosion, un des parents prend soin des alevins pendant que l'autre défend le territoire (Philippart & Ruwet, 1982). Chez les incubateurs buccaux, *Sarotherodon* et *Oreochromis*, chaque mâle défend un territoire et le nid qu'il a creusé et cherche à y attirer une femelle. Une fois dans le nid, la femelle y dépose des ovules qui sont immédiatement fécondés par le mâle. Le parent incubateur (le mâle chez *Sarotherodon* et la femelle chez *Oreochromis*) prend alors les œufs fécondés dans sa bouche, où ils seront incubés. Pendant l'incubation, qui se poursuit au-delà de l'éclosion, au moins jusqu'à la première alimentation exogène des alevins, le parent incubateur ne s'alimente pas ou presque pas (Philippart & Ruwet, 1982).

En aquaculture, l'efficacité de la reproduction due à ces soins parentaux est accentuée par la précocité de la maturité sexuelle (Lowe-McConnell, 1982). Ainsi, la maturité sexuelle peut être observée chez *S. melanotheron* à 3,8 cm (Eyeson, 1983), chez *O. mossambicus* à 4,2 cm (Arrignon, 1969) et chez *T. zillii* à 6 cm (Dadzie & Wangila, 1980).

La ponte est continue chez les tilapias, une même femelle peut produire une nouvelle cohorte d'alevins toutes les 4 à 6 semaines (Ruwet et al., 1976; Mélard & Philippart, 1981), et même plus fréquemment (15 jours) si la garde est interrompue par l'enlèvement de la ponte (Tacon et al., 1996; Tacon et al., 2000). L'absence de synchronisation dans les cycles reproducteurs des femelles au sein d'une même population se traduit par une production continue d'alevins, pour autant que les conditions environnementales (température et photopériode) soient favorables. L'ensemble de ces particularités, conduit en milieu fermé et en situation de compétition alimentaire, à une rapide surpopulation et au nanisme (Baroiller et al., 2009a).

L'efficacité de la reproduction chez le tilapia repose sur ses caractéristiques physiologiques et/ou éthologiques (Mc Bay, 1961; Philippart & Ruwet, 1982; Eyeson, 1983; Owusu-Frimpong, 1987). Si l'efficacité de cette reproduction spontanée en captivité a favorisé le développement de l'aquaculture du tilapia du Nil, son contrôle est apparu strictement nécessaire pour empêcher les reproductions et bénéficier de la meilleure croissance des mâles par rapport aux femelles, permettant ainsi d'optimiser la rentabilité des entreprises aquacoles (Beardmore et al., 2001; Toguyéni et al., 2002). Depuis les années 75, la production de populations monosexes mâles de tilapia du Nil est devenue un standard, motivée en cela par la meilleure croissance des mâles par rapport aux femelles (Baroiller & D'Cotta, 2001; Beardmore et al., 2001) mais aussi parce que cela permet à la fois de limiter les reproductions non contrôlées chez cette espèce et d'éviter par voie de conséquence la surpopulation et le nanisme (Baroiller et al., 2009a). Il est bien connu qu'un dimorphisme de croissance liée au sexe peut apparaître très vite chez le tilapia du Nil surtout en condition de confinement (Baras & Mélard, 1997). De plus, il a été démontré que lorsque des mâles et des femelles sont élevés en populations monosexes, le dimorphisme sexuel de la croissance est plus marqué que dans des groupes mixtes où sont mélangés les deux sexes (Toguyéni et al., 2002). Par ailleurs les mâles ont un meilleur taux de conversion alimentaire (Toguyéni et al., 1997).

L'intérêt de produire ou d'élever des groupes monosexes mâles chez *O. niloticus* est donc multiple.

**Tableau 1.** Présentation des avantages et inconvénients des différentes méthodes de production de monosexes mâles de tilapia. Données complétées de Beardmore et al. (2001), Baroiller et al. (2009a), Kwon et al. (2000) et Singh et al. (2012).

Méthode	Avantages	Inconvénients
Sexage manuel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tri mécanique rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas fiable</li> <li>- Laborieux</li> <li>- Important taux d'erreur même avec une main d'oeuvre qualifiée</li> <li>- Perte d'inputs</li> </ul>
Inversion hormonale du sexe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fort taux de masculinisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativement coûteux</li> <li>- Résidus et produits de dégradation</li> <li>- Exposition des personnes au contact des molécules</li> <li>- Besoin d'un grand niveau de contrôle des procédures</li> <li>- - Problème d'éthique pour la consommation des poissons traités</li> </ul>
Hybridation	Procédure assez facile	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibles impacts négatifs par échappement dans la nature</li> <li>- Contamination des géniteurs</li> <li>- Faible croissance des hybrides</li> <li>- Difficulté d'entretien de lignées « pures » de géniteurs</li> </ul>
Androgénèse	Convient mieux aux espèces à homogamétie mâle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas adaptée pour une production de masse</li> <li>- Pas très fiable</li> </ul>
Super mâle YY	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Convient mieux aux espèces à hétérogamétie mâle</li> <li>- Fiable</li> <li>- Pas de danger pour l'environnement</li> </ul>	Nécessite une certaine vigilance pour la sélection et le maintien des géniteurs

**Tableau 1.** (Suite) Présentation des avantages et inconvénients des différentes méthodes de production de monosexes mâles de tilapia. Données complétées de Beardmore et al. (2001), Baroiller et al. (2009a), Kwon et al. (2000) et Singh et al. (2012).

<b>Méthode</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Triploidie	Convient aux espèces à homogamétie mâle	Difficile à adopter pour une production commerciale de plusieurs espèces
Transgénèse	Pourrait être réalisée avec une forte efficacité	Problèmes d'éthique vis-à-vis des consommateurs
Fortes températures	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode propre pour l'environnement</li> <li>- Aussi bonne croissance des mâles induits</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Besoin de sélection d'une lignée thermosensible</li> <li>- Faible survie</li> </ul>
Inhibition de l'aromatase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fort taux de masculinisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativement coûteux</li> <li>- Résidus et produits de dégradation</li> <li>- Exposition des personnes aux molécules nocives</li> <li>- Questions d'éthique et de santé publique</li> <li>- Besoin d'un haut niveau de contrôle</li> </ul>

### 1.3. Le contrôle du sexe chez les tilapias

Historiquement, la production de populations monosexes mâles chez le tilapia a d'abord reposé sur le sexage manuel et l'hybridation entre espèces ayant différents systèmes de déterminisme sexuel (Hickling, 1960; Jalabert et al., 1971). Plusieurs autres méthodes ont été ensuite mises au point, comme l'inversion hormonale puis l'utilisation de mâles YY et plus récemment le contrôle par la température (Baroiller et Jalabert, 1989; Beardmore et al., 2001; Devlin & Nagahama, 2002; Baroiller et al., 2009a).

#### 1.3.1. Le sexage manuel

Le sexage manuel est l'une des premières méthodes adoptées afin de résoudre les problèmes d'élevage liés à la reproduction continue, non saisonnière et asynchrone entre les femelles, et tirer profit de la meilleure croissance des mâles (Huet, 1972 ; Baroiller & Jalabert, 1989). En effet, lorsque les individus ont environ 30g de poids corporel, il est possible de discriminer les mâles des femelles sur la base du dimorphisme de la papille uro-génitale. Cela conduit à se débarrasser des femelles qui ont pourtant été élevées pendant 4-5 mois, nécessite pour chaque nouvelle production, de mobiliser du personnel formé pour ce sexage, et induit des coûts en ressources, en temps et en main d'œuvre. En outre, compte tenu de la précocité de la maturité sexuelle chez le tilapia du Nil, certaines femelles sont quasiment en âge de se reproduire au moment de ce sexage manuel. Et même avec une main d'œuvre expérimentée, les erreurs de tri peuvent atteindre jusqu'à 10 % (Lazard, 1980; Toguyéni, 1996).

#### 1.3.4. Contrôle génétique

##### a) L'hybridation

L'hybridation entre deux espèces de tilapia possédant des déterminismes du sexe à homogamétie opposée (XX/XY *versus* ZZ/ZW) peut donner une population monosexue mâle. Hickling (1960) fut le premier à réussir à produire une descendance 100% mâle issue d'un

croisement entre des géniteurs d'*O. mossambicus* femelle (XX) et d'*O. hornorum* mâle (ZZ). De même, des populations monosexes mâles furent obtenues après croisement entre *O. niloticus* (XX) et *O. urolepis hornorum* (ZZ) (Wohlfarth et al., 1990; Wohlfarth, 1994). Cependant, l'aspect de ces hybrides est souvent peu apprécié des consommateurs (coloration très foncée), leur croissance est généralement plus faible que celle de *O. niloticus*, et les problèmes environnementaux liés au risque de fuite dans l'environnement d'individus hybrides ne peuvent être oubliés. Des descendance mâles sont également obtenues par hybridation entre *O. niloticus* (XX) et *O. aureus* (ZZ) (Wohlfarth et al., 1990 ; Wohlfarth, 1994) ou entre *O. niloticus* et *O. macrochir* (Jalabert et al., 1971). Si ces derniers hybrides ont de belles performances de croissance et un joli aspect, cependant du fait d'un déterminisme du sexe complexe, ces croisements ne produisent pas toujours des populations 100% mâles (Mires, 1977; Wohlfarth, 1994). Enfin, ils nécessitent de disposer d'un plus grand nombre de géniteurs pour compenser un taux de reproduction naturelle plus faible qu'en intra-spécifique. A l'heure actuelle, l'utilisation d'hybrides reste d'actualité chez les tilapias, essentiellement pour produire du tilapia rouge « red Florida », issu de croisements entre *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus* et *O. urolepis hornorum*, dont la couleur rappelle celle d'espèces de poissons de corail, et donne une meilleure valeur sur certains marchés (i.e. marché nord-américain, Thaïlande, Malaisie). Enfin les hybrides *O. niloticus* x *O. aureus* sont toujours utilisés dans certaines fermes en Israël mais essentiellement pour bénéficier à la fois de la bonne croissance d'*O. niloticus* et de la meilleure tolérance aux basses températures d'*O. aureus*.

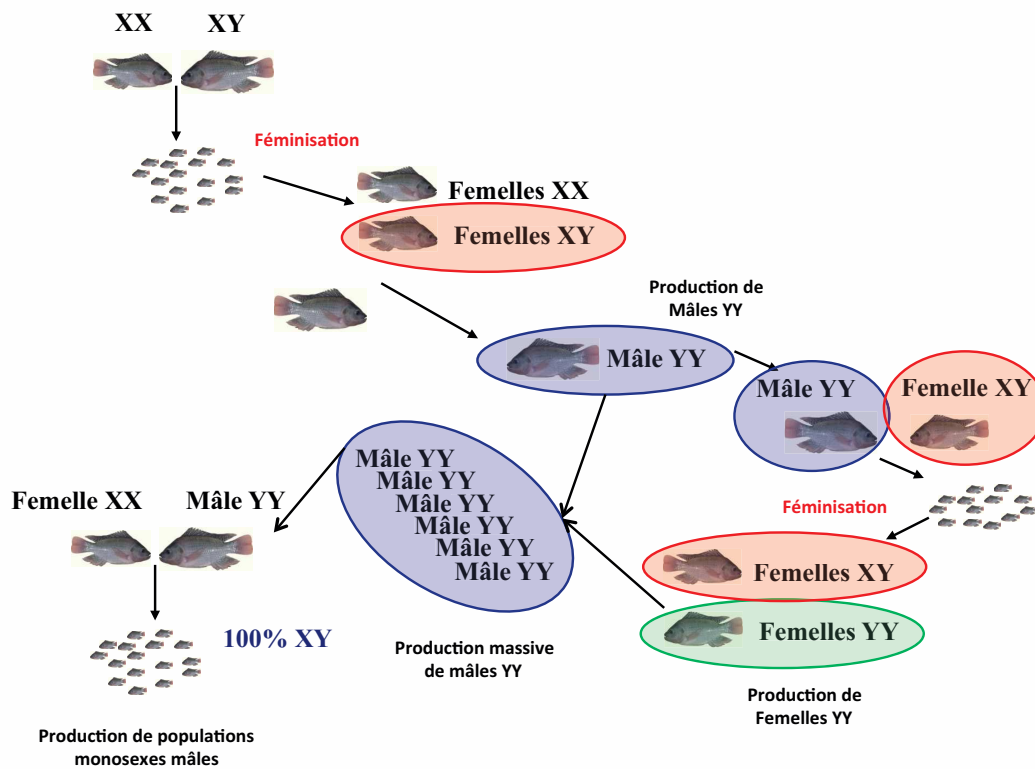
#### b) Les mâles YY

La production de mâles YY à descendance génétiquement monosex mâle XY constitue une autre approche dont l'avantage réside dans l'absence de traitement des populations monosexes mâles (Baroiller & Jalabert, 1989; Scott et al., 1989). Deux approches sont possibles pour leur production :

- Approche classique (féminisation et croisement de deux géniteurs hétérogamétiques) :

Si des traitements stéroïdiens sont nécessaires pour l'obtention de femelles XY (éthynyl-œstradiol), qui croisées par des mâles XY fourniront des mâles YY, les descendance monosexes mâles qu'ils généreront ne sont pas traitées. Mais leur production est longue et

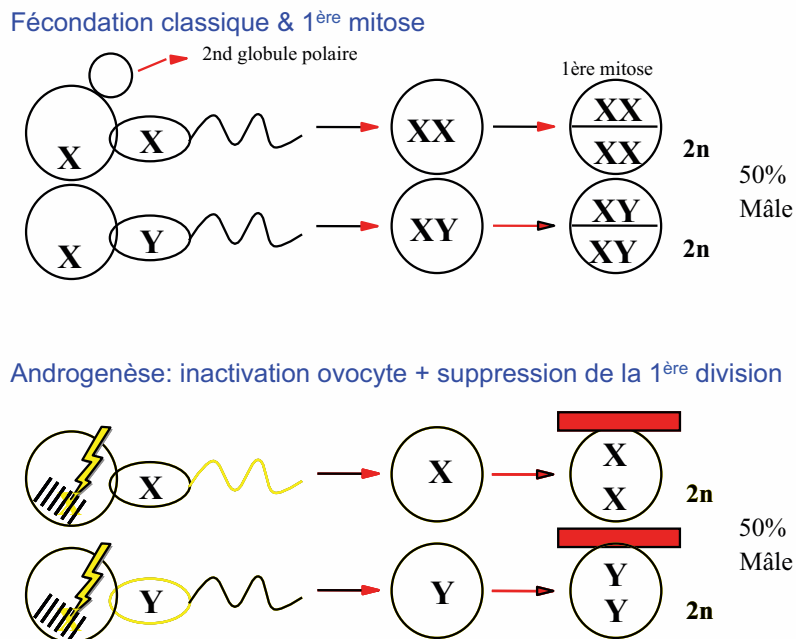
difficile (Figure 1), leur coût important, et il importe de ne pas les reproduire avec des femelles d'autres souches.



**Figure 1.** Schéma de production de mâles et femelles YY pour une production génétique de populations monosexes mâles

- Approche par androgenèse:

Elle consiste à inactiver les ovules par un traitement aux UV qui casse l'ADN maternel et le rend non utilisable pour le futur embryon, puis à féconder cet ovule par du sperme classique issu d'un mâle XY (Figure 2). Le génome de l'embryon sera donc uniquement apporté par le père. Selon le chromosome sexuel porté par le spermatozoïde, l'embryon haploïde sera X ou Y. L'inhibition de la première mitose par un choc de température ou de pression permet de restaurer la diploïdie de l'embryon et d'assurer sa viabilité (Myers et al., 1995; Komen & Thorgard, 2007).



**Figure 2.** Production de mâles YY par androgenèse

Quelle que soit l'approche utilisée pour leur production, le croisement entre les mâles YY et les femelles XX ne produit pas systématiquement 100% de mâles et dans certains cas, plus de 35% de femelles peuvent même être obtenues dans leurs descendance (Baroiller & D'Cotta 2001). Logiquement, de forts effets souches et familles sont constatés. Il est donc nécessaire de sélectionner des mâles YY à descendance réellement monosexue. Les deux entreprises qui commercialisent de tels mâles YY les vendent généralement accompagnées de femelles, car si les producteurs utilisent des géniteurs femelles d'une autre souche, les sexe-ratios obtenus sont généralement beaucoup moins bon. Par ailleurs, si la qualité du sperme des YY n'est pas différente de celle de mâles génétiques (Gennotte et al., 2012), en revanche les mâles YY sont décrits comme plus agressifs que les mâles XY (Jordaan, 2004), ce qui peut réduire à la fois la fréquence et le nombre des reproductions (Baroiller et al., 1996; Mair et al., 1997; Ovidio et al., 2002).



#### 1.3.4. Contrôle hormonal et inhibition de l'aromatase

Les travaux de Yamamoto (1969) ont démontré que les stéroïdes sexuels pouvaient orienter la différenciation sexuelle chez les poissons. En effet, des phénotypes mâles ou femelles fonctionnels peuvent être respectivement induits par des traitements avec des androgènes ou des œstrogènes (Hunter & Donaldson, 1983 ; Baroiller et al., 1999 ; Devlin et Nagahama, 2002).

L'utilisation d'androgènes dans l'alimentation constitue une technique simple et très efficace. Développée dans les années soixante-dix (Jalabert et al., 1974; Shelton et al., 1978; Mair et al., 1987), elle demeure la principale méthode de masculinisation utilisée dans les fermes de production de tilapia dans tous les pays où l'usage des hormones est autorisé, et même au delà. Les traitements hormonaux utilisés pour l'inversion sexuelle chez le poisson sont le plus souvent appliqués dès la première alimentation. Après mise en solution dans de l'éthanol, les androgènes sont incorporés dans l'aliment, puis l'alcool est évaporé sous hotte. Des traitements par immersion (baignation) au moment de l'éclosion, ou pendant la phase embryonnaire sont également possibles, mais les doses efficaces sont beaucoup plus élevées et la mortalité est importante (Goetz et al., 1979 ; Van den Hurk & Van Oordt, 1985 ; Rougeot et al., 2007)

Le contrôle hormonal du sexe chez le tilapia doit prendre en compte plusieurs variables de traitement qui sont a) la nature des androgènes utilisés (naturels ou artificiels), et b) s'ils sont aromatisables ou non-aromatisables. Ces variables qualitatives prennent en compte la durée des traitements et la dose appliquée, de même que des facteurs environnementaux, comme la température de l'eau (Baroiller et al., 1995a, 2009a).

Pour être efficace, un traitement hormonal doit débuter avant l'initiation de la différenciation gonadique, et sa durée tout comme la dose d'androgènes sont dépendantes de l'espèce et de la nature du stéroïde (Guerrero, 1982; Pandian & Varadaraj, 1987) ; de fait, le traitement doit couvrir au moins en partie la période de différenciation sexuelle (Baroiller, 1988).

Si les doses de stéroïdes ou la période et la durée de traitement sont mal choisis, ses effets pourront être transitoires, c'est-à-dire que des poissons seront incomplètement masculinisés avec de possibles retours à leur phénotype original (Lim & Wong, 1996; Olito & Brock, 1991). Chez le tilapia du Nil, le traitement optimal par la 17 $\alpha$ -methyltestostérone (17MT) repose sur une dose de 50mg/kg administré en fin de résorption de la vésicule vitelline (10 jpf environ) et pour une durée minimale 3-4 semaines. En eau claire (recirculée), une dose de 30-

40 mg/kg d'aliment pendant 3 semaines donne de très bons résultats ; en étang, ou en eau riche en plancton, la dose doit être de 50-60mg/kg et un traitement de 4 semaines est conseillé (Baroiller & Jalabert, 1989; Guerrero & Guerrero, 1988; Vera Cruz & Mair, 1994; Mélard et al., 1995). Des androgènes naturels ont également été utilisés, comme la 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione (11 $\beta$ OHA4), pour laquelle des doses comparables peuvent être utilisées pour le tilapia du Nil (Baroiller & Toguyéni, 1996) ou le tilapia rouge, pour une durée de traitement de 28 jours (Desprez et al., 2003).

Bien utilisée, cette technique est d'une impressionnante efficacité, et certaines grosses sociétés asiatiques obtiennent systématiquement des pourcentages de mâles compris entre 99 et 100% (Baroiller, comm. pers). Cependant cette méthode soulève de nombreuses questions relatives à son impact sur l'environnement (biodiversité et qualité de l'eau), sur la santé des ouvriers aquacoles qui sont en contact fréquents avec l'eau et les sédiments des étangs où sont souvent traités les alevins, sur celle des consommateurs, mais aussi sur l'image de marque de l'aquaculture du tilapia.

L'inhibition de l'activité de l'aromatase comme de l'expression de son gène, *cyp19a1a*, conduit à la masculinisation d'alevins monosexes femelles (Afonso et al., 2001; Baroiller et al., 1995a, b; Guiguen et al., 1999; Kwon et al., 2000; Paul-Prasanth et al., 2013). L'inhibiteur de l'aromatase ATD (1,4,6-androstatriene-3-17-dione) à 150 mg.kg<sup>-1</sup> d'aliment induit plus de 75% de masculinisation dans une population monosex femelle (XX) de tilapia du Nil (Guiguen et al., 1999). De même, une masculinisation de plus de 80% des individus a été obtenue en utilisant le fadrozole à une dose de 500 mg.kg<sup>-1</sup> d'aliment dans une population monosex femelle (Kwon et al., 2000) et jusqu'à 90% de masculinisation en utilisant le tamoxifène à une dose de 200 $\mu$ g.l<sup>-1</sup> d'eau dans une population mixte du tilapia du Nil (Singh et al., 2012).

La supplémentation en E2 peut également contrer les effets masculinisants induits par une inhibition de l'aromatase (Kitano et al., 2012; Paul-Prasanth et al., 2013) ou par un traitement à fortes températures qui inhibent l'expression de *cyp19a1a*. Chez les téléostéens comme le tilapia du Nil, il existe deux gènes codants pour l'aromatase, *cyp19a1a* et *cyp19a1b*, provenant de la duplication du génome des poissons actinoptérygiens (Callard & Tchoudakova, 1997; Tchoudakova & Callard, 1998 ; Chang et al., 2005). Le gène *cyp19a1a* est principalement exprimé dans la gonade tandis que le gène *cyp19a1b* est principalement exprimé dans le cerveau (Böhne et al., 2013). Dans la majorité de ces espèces, et notamment chez le tilapia du Nil, le niveau d'expression du gène *cyp19a1a* augmente dans le cas d'une différenciation ovarienne, (D'Cotta et al., 2001 ; Kwon et al., 2001; Sudhakumari et al.,

2005 ; Ijiri et al., 2008 ; Guiguen et al., 2010). C'est la suppression d'E2 plutôt que la synthèse des androgènes qui favorise la masculinisation, tandis que des niveaux élevés d'E2 tendent à féminiser les gonades (Govoroun et al., 2001 ; Nakamura et al., 2003 ; Bhandari et al., 2006 ; Guiguen et al., 2009).

Un traitement par un inhibiteur de l'aromatase peut donc constituer une alternative à l'utilisation des androgènes. L'ATD (1,4,6- androstatriene-3–17-dione) et le fadrozole (Guiguen et al., 1999; Kwon et al., 2000 ; Afonso et al., 2001) ont notamment été utilisés avec succès chez le tilapia. Même si ces inhibiteurs sont couramment utilisés en médecine notamment pour soigner des cancers oestrogéno-dépendants, ils peuvent avoir des effets secondaires voire même une certaine toxicité. Il reste donc à analyser l'élimination de tels anti-aromatase et de leurs résidus par les alevins pendant et après le traitement, et cela jusqu'à une taille commerciale, ainsi que l'éventuelle toxicité de ces produits pour les consommateurs comme pour l'environnement.

#### 1.3.4. Contrôle par les fortes températures

Il a été également démontré que des températures de plus de 32°C chez le tilapia du Nil peuvent masculiniser les descendance thermosensibles lorsque celles-ci sont traitées par de fortes températures pendant au moins 10 jours et cela dès l'âge de 10 jpf (Baroiller et al., 1995a; 1996; 2009a). Cette thermosensibilité est un trait héritable dont les facteurs sont apportés par les deux parents (Baroiller & D'Cotta, 2001; Wessels & Hörtsgen-Schwark, 2007), et tous les individus d'une même descendance n'ont pas la même sensibilité (Baroiller et al., 1996; Baroiller et al., 2009a). C'est une approche respectueuse de l'environnement et de la santé du consommateur, et il est possible de sélectionner des lignées thermosensibles afin d'augmenter la proportion de masculinisation (Tessema et al., 2006; Wessels & Hörtsgen-Schwark, 2007 ; Baroiller et al., 2009).

Baroiller et al. (1995a, b) ont été les premiers à démontrer que la température influence le sexe-ratio chez le tilapia du Nil. En effet ces travaux ont prouvé que des températures supérieures à 32°C peuvent conduire à une masculinisation fonctionnelle des gonades femelles XX. Les périodes critiques de sensibilité à la température (thermosensibilité) et aux traitements par des hormones exogènes débutent en fin de résorption de la vésicule vitelline (vers 10 jpf). Néanmoins, la durée efficace minimum d'un traitement thermique est plus

courte (10 jours) que celle d'un traitement hormonal (21 jours) (Baroiller et al., 1995a; Baroiller & Toguyéni, 1996).

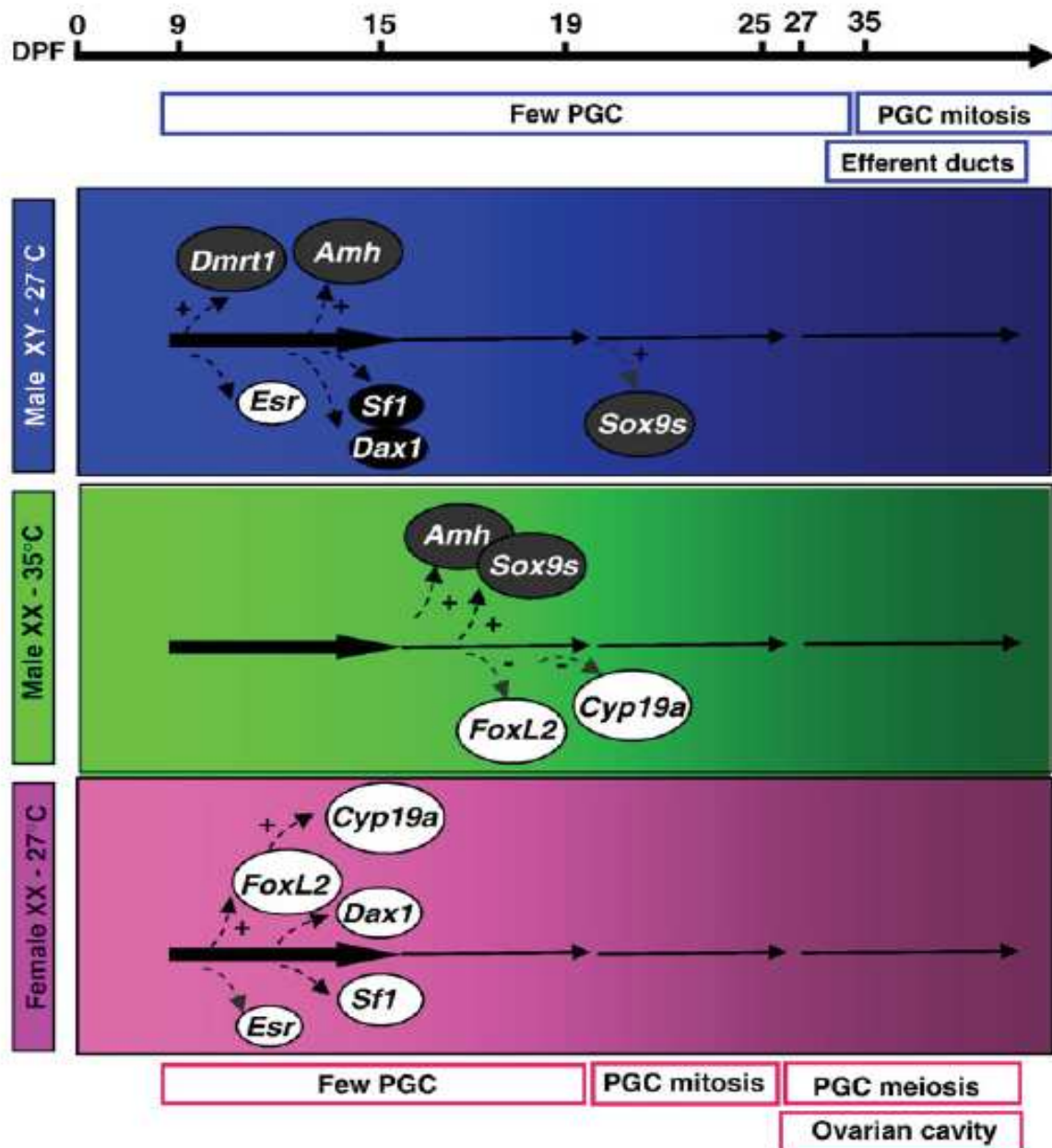
La thermo-sensibilité rencontrée chez le tilapia du Nil a été aussi observée chez d'autres espèces de tilapias, notamment le tilapia rouge de la souche red Florida (Baroiller et al., 1995b; Baroiller et al., 1996). De même l'élevage de larves d'*O. aureus* à 34-35°C jusqu'à 28-40 jours après éclosion conduit à de fortes masculinisation (Baras et al., 2000; 95-100%, Desprez & Melard, 1998). Chez le tilapia du Nil, il existe une interaction entre le génotype et la température (Baroiller et al., 1995b; Baroiller & Clota, 1998; Baroiller & D'Cotta, 2001). Certaines descendance de génotype XX traitées à fortes températures ne présentent aucune sensibilité à la température (et ne sont donc pas masculinisées) tandis que d'autres descendance sont au contraire extrêmement sensibles et les sexe-ratios induits par ces traitements peuvent parfois (mais rarement) atteindre 100% de mâles (Baroiller et al., 1995a). Des croisements diallèles entre plusieurs femelles et plusieurs mâles ont démontré l'existence d'un effet parental (paternel et maternel) sur la thermosensibilité. La thermosensibilité d'une descendance dépend donc de facteurs apportés par les deux parents (Baroiller et D'Cotta, 2001; Baroiller et al., 2009a). Les descendance successives d'un même couple présenteront toujours le même niveau de thermosensibilité; en revanche, si l'un des deux parents est changé, la thermosensibilité des nouvelles descendance sera également modifiée. Un même géniteur femelle peut donc donner aussi bien des descendance sensibles que non sensibles selon le père utilisé pour la reproduction. De même, un même géniteur mâle peut générer des descendance thermosensibles comme non sensibles, selon la mère utilisée. (Baroiller & Clota, 1998; Baras et al., 2001; Baroiller & D'Cotta, 2001).

La thermosensibilité du tilapia du Nil a aussi été démontrée chez six populations naturelles, avec des niveaux de réponse très variables quant à la proportion de descendance masculinisées et au pourcentage de mâles obtenus dans les lots traités, traduisant ainsi l'existence d'interactions génétique-environnement (Tessema et al., 2006 ; Bezault et al., 2007; Baroiller et al., 2009a).

### **Quelques gènes importants de la différenciation sexuelle chez les téléostéens**

Plusieurs gènes et familles de gènes impliqués dans la différenciation du sexe chez d'autres classes de vertébrés ont été également caractérisés chez les poissons traduisant ainsi une forte conservation des acteurs de cette cascade chez les Vertébrés (Devlin & Nagahama, 2002).

Inversement, les déterminants sexuels majeurs, qui dirigent les mécanismes du déterminisme du sexe et la cascade, ne sont pas conservés entre unités taxonomiquement distantes, et chez les poissons peuvent même différer entre espèces phylogénétiquement proches. Les connaissances sur les mécanismes moléculaires de la détermination sexuelle sont encore peu étendues chez les poissons chez lesquels la régulation de certains gènes est différente de ce qui est observé chez les mammifères (Shoemaker & Crews, 2009).



**Figure 3.** Schéma de régulation des gènes dans les gonades de tilapia du Nil femelles XX (rose) mâles XY (bleu) et des mâles induits par de fortes températures XX (vert). (Baroiller et al., 2009a).

Dans le cadre de la présente étude chez le tilapia, quelques gènes nous ont semblé intéressants à analyser pendant la différenciation sexuelle naturelle ou induite par différents traitements masculinisants:

### ***Amh (Mis)***

L'hormone anti-müllérienne (*amh*), également connue sous le nom de substance inhibitrice müllérienne (*MIS*), inhibe le développement des canaux de Müller chez les embryons mâles et est sécrétée par les cellules de Sertoli (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991; Josso et al., 1993). L'*amh* agit par interaction avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules des tissus cibles (Piek et al., 1999). Cependant, seul le récepteur de type II a été identifié comme étant fonctionnel (Clarke et al., 2001; Vissier et al., 2001; di Clemente et al., 2003), tandis que le rôle du récepteur de type I n'est encore pas compris (Vissier, 2003). La corrélation entre l'expression temporelle de l'*amh* et de *Sf-1* (steroidogenic factor 1) conforte l'idée que ce gène est essentiel dans la transcription de l'*amh* (Hatano et al., 1994; Shen et al., 1994; Smith et al., 1999 ; Chi et al., 2014).

Parmi les poissons, seules les espèces d'Actinoptérygiens, parmi lesquels les esturgeons (*Acipenser* spp.) développent des canaux de Müller, lesquels ne dégénèrent pas chez les mâles comme ce qui se passe chez les Mammifères (Wrobel, 2003). Les poissons téléostéens n'ont pas de canaux de Müller mais possèdent des orthologues d'*amh* qui présentent des profils d'expression variable en fonction du sexe pendant la différenciation sexuelle de la gonade et/ou à l'âge adulte, comme observé chez l'anguille japonaise *Anguilla japonica* (Miura et al., 2002), le cardeau hirame (Yoshinaga et al., 2004), le poisson zèbre (Rodriguez-Mari et al., 2005), le bar *Dicentrarchus labrax* (Halm et al., 2007) et la truite arc-en-ciel (Baron et al., 2005) et le tilapia du Nil (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2011; 2013). De plus l'*amh* est fortement exprimée chez le pejerrey *Odontesthes bonariensis* en condition de températures masculinisantes (Fernandino et al., 2008b), *Paralichthys olivaceus* (Kitano et al., 2007) et le tilapia du Nil *O. niloticus* (Poonlaphdecha et al., 2013). De plus chez le pejerrey et *Paralichthys olivaceus* l'expression de l'*amh* est modulée par les œstrogènes et les inhibiteurs de l'aromatase ou les antagonistes des œstrogènes tels que le tamoxifène (Kitano et al., 2007 ; Fernandino et al., 2008b).

Chez les individus adultes, les profils d'expression de l'*amh* diffèrent aussi selon les espèces. Chez le medaka il n'y a pas de dimorphisme sexuel dans l'expression de l'*amh*. Chez les

juvéniles du poisson zèbre, le profil de l'expression de l'*amh* a clairement montré un dimorphisme sexuel, puisque l'expression était détectable dans les gonades des mâles mais pas dans celles des femelles. En revanche, chez les adultes l'*amh* était exprimée dans les gonades des mâles comme chez les femelles. Dans les testicules des adultes, l'*amh* était fortement exprimée autour des cellules de Sertoli (Rodríguez-Mari et al., 2005; Schulz et al., 2007). Dans les ovaires, l'*amh* est exprimé dans les follicules en croissance, dans les oocytes et dans les régions folliculaires (von Hofsten et al., 2005).

Chez l'hirame, l'*amh* est exprimé de façon dimorphique pendant la différenciation sexuelle, étant à peine détectable dans les ovaires (Yoshinaga et al., 2004). Le gène de l'*amh* pourrait exercer une répression sur la synthèse des œstrogènes en inhibant l'activité de l'aromatase comme ce qui est observé chez les ovaires des fœtus des ovins traités *in vivo* avec de l'*amh* (Vigier et al., 1989).

Chez le tilapia du Nil, l'*amh* est déjà exprimée dans les gonades indifférenciées dans les deux sexes, puis plus fortement dans les gonades des mâles, mais pas dans les gonades des femelles (Ijiri et al., 2008). Poonlaphdecha et al. (2011) ont montré que l'*amh* est transcrit dans le cerveau du Tilapia du Nil dès l'âge de 10 jpf, suggérant que la différenciation sexuelle pourrait se mettre en place plus tôt dans le cerveau que dans les gonades.

Chez la truite arc-en-ciel, l'*amh* est exprimé dans les deux sexes dès 28 jpf. Après 37 jpf, l'*amh* est fortement exprimée chez les mâles, dans les cellules somatiques près des cellules germinales (Vizziano et al., 2007), traduisant le fait que l'*amh* joue un rôle pendant la masculinisation des gonades.

## ***Sox9***

*Sox9*, SRY(sex determining region Y)-box 9, est un gène qui code pour un facteur de transcription et agit dans le processus de la différenciation testiculaire chez les Vertébrés (DiNapoli & Capel 2008). En son absence, une inversion sexuelle du sexe mâle vers le sexe femelle a lieu (Wagner et al., 1994; Chaboissier et al., 2004). Le gène *sox9* régule l'expression de l'*amh* dans les cellules de Sertoli (souris *Mus musculus*, Yao & Capel, 2005).

Chez les téléostéens comme la truite arc-en-ciel (Takamatsu et al., 1997; Vizziano et al., 2007), le poisson zèbre (Chiang et al., 2001; von Hofsten et al., 2005), le medaka (Yokoi et al., 2002), le guppy (Shen et al., 2007) la carpe commune (Du et al., 2007) et le tilapia du Nil



(D'Cotta et al., 2007), le gène *sox9* a été identifié et dans la plupart des cas, deux gènes ont été trouvés qui sont considérés comme orthologues du gène *sox9* chez les tétrapodes. Chez le tilapia du Nil de forts niveaux d'expression de *sox9a* et de *sox9b* ont été relevés dans les gonades d'individus XY de 20 à 25 jpf (D'Cotta et al., 2007) alors que d'autres travaux sur la même espèce suggèrent davantage que l'expression de *sox9a* dans les gonades d'individus mâles XY est plus ou moins constante de 9 à 29 jpf et n'augmente que par la suite (Ijiri et al., 2008). De même, chez la truite arc-en-ciel, l'un des homologues de *sox9* a montré un profil d'expression sexuellement dimorphique, avec de forts niveaux d'expression chez les mâles avant la différenciation sexuelle (Vizziano et al., 2007). Les profils d'expression chez les deux dernières espèces suggèrent que *sox9* joue un rôle tardif dans le développement testiculaire.

### ***Dmrt1***

Le facteur de transcription *dmrt1* (double sex and mab-related transcription factor 1) est un gène impliqué dans le développement des testicules chez les vertébrés. Des homologues de *dmrt1* ont été identifiés chez les poissons téléostéens tels que la truite arc-en-ciel (Marchand et al., 2000), le medaka (Nanda et al., 2002) et le tilapia du Nil (Guan et al., 2000).

Chez le medaka, *dmrt1* est autosomal et affecte la différenciation testiculaire (Kobayashi et al., 2004; Matsuda et al., 2005). Par ailleurs, une copie fonctionnelle du gène *dmrt1* nommée DMY est identifiée sur le chromosome Y, et a été proposée comme étant le gène du déterminisme sexuel chez cette espèce (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002).

Chez le poisson zèbre, *dmrt1* ne montre pas de dimorphisme sexuel dans son profil d'expression. En effet, *dmrt1* est exprimé de façon non dimorphique chez le poisson zèbre dès avant le début de la différenciation de la gonade, laissant donc supposer que *dmrt1* joue un rôle pendant le développement de la gonade chez les mâles comme chez les femelles (Guo et al., 2005). Par contre, le gène *dmrt1* est fortement exprimé chez le tilapia du Nil à des températures masculinisantes (Poonlaphdecha et al., 2013) et est positivement régulé chez les mâles génétiques XY du tilapia du Nil (Ijiri et al., 2008). Le gène *dmrt1* est également exprimé spécifiquement dans les cellules de Sertoli des gonades mâles très tôt pendant la différenciation testiculaire chez la truite arc-en-ciel (Marchand et al., 2000). De plus, lorsque le tilapia du Nil subi un traitement à l'estradiol (E2) *dmrt1* n'est pas exprimé alors qu'il est exprimé chez des mâles induits XX (Kobayashi et al., 2003). De même *dmrt1* est exprimé de



façon dimorphique sous traitement à températures masculinisantes et est inhibé chez le pejerrey *Odontesthes bonariensis* par un traitement à l'E2 (Fernandino et al., 2008a).

Plus récemment, il a été démontré que *dmrt1* régule négativement l'expression de *cyp19a1a* chez le tilapia du Nil (Wang et al., 2010) et même soupçonné de réguler à la fois *cyp19a1a* et *foxl2* chez cette espèce (Poonlaphdecha et al., 2013). Par conséquent, *dmrt1* serait un répresseur de la synthèse d'E2 dans les gonades du tilapia du Nil entraînant ainsi leur masculinisation. De plus, les fortes températures ont induit une augmentation concomitante de l'*amh* et de *dmrt1* suivie d'une diminution de l'expression de *foxl2* et de *cyp19a1a* dans les testicules du tilapia du Nil (Poonlaphdecha et al., 2013).

### ***Cyp19* (aromatase)**

Chez les téléostéens, y compris le tilapia il existe deux gènes de l'aromatase (*cyp19a1a* et *cyp19a1b*) nés de la duplication du génome (Callard & Tchoudakova, 1997; Tchoudakova & Callard, 1998; Chang et al., 2005). Le gène *cyp19a1a* est principalement exprimé dans les gonades tandis que le gène *cyp19a1b* est principalement exprimé dans le cerveau mais une inversion de ces distributions a été relevé chez les cichlidées d'Afrique de l'Est (Böhne et al., 2013). Le plus souvent, c'est l'expression du gène gonadique *cyp19a1a* qui augmente pendant la différenciation ovarienne chez plusieurs espèces dont le tilapia du Nil (Guiguen et al., 1999; D'Cotta et al., 2001; Kwon et al., 2001; Sudhakumari et al., 2005; Ijiri et al., 2008; Guiguen et al., 2010).

Les traitements masculinisants par les fortes températures, ou les androgènes ou les inhibiteurs de l'aromatase suppriment l'expression de *cyp19a1a* (D'Cotta et al., 2001; Kwon et al., 2001; Bhandari et al., 2006; Ijiri et al., 2008), et donc inhibent la synthèse d'œstrogène et entraînent donc le développement des testicules. De plus des traitements avec le tamoxifène qui bloque les récepteurs d'œstrogènes ont également entraîné une diminution de l'expression de *cyp19a1a* (Kitano et al., 2007). Chez les téléostéens dont le déterminisme sexuel est influencé par la température, l'expression de l'aromatase gonadique est plus faible lorsque les larves sont incubées à des températures masculinisantes (D'Cotta et al., 2001a; Kitano et al., 1999, 2007). Chez le pejerrey *Odontesthes bonariensis*, l'aromatase est impliquée dans la différenciation ovarienne et présumée indispensable dans le mécanisme du déterminisme sexuel lié à la température chez ce poisson (Karube et al. 2007; Fernandino et al., 2008a): à température féminisante le gène *cyp19a1a* est exprimé plus fortement tandis

qu'à température masculinisante il n'est tout simplement pas exprimé. De façon similaire, chez le tilapia du Nil, l'expression du gène *cyp19a1a* est fortement influencée par la température pendant la différenciation sexuelle (D'Cotta et al., 2001a; Poonlaphdecha et al., 2013). A température normale (i.e. ne modifiant pas le sexe-ratio), des taux élevés d'expression du gène *cyp19a1a* ont été relevés dans les gonades des femelles génétiques. En revanche, les individus XX masculinisés par les fortes températures ont montré de faibles taux d'expression d'aromatase, comparables à ceux observés chez les mâles génétiques XY.

Par contre de fortes expressions de *cyp19a1b* sont observées dans les cerveaux de truite arc-en-ciel en processus de masculinisation (Vizziano et al., 2007) comme chez le pejerrey maintenu sous fortes températures (Strobl-Mazzula et al., 2008). De même dans le cerveau du tilapia du Nil, des différences d'expression liées au sexe ont été observées pour ce qui concerne l'activité de l'aromatase, avec de forts niveaux relevés chez les femelles (D'Cotta et al., 2001). Chez la truite arc-en-ciel dans le cerveau des mâles, on a observé une forte augmentation de l'expression des gènes *esr1*, *esr2a*, et *esr2b* en même temps que celle de l'aromatase du cerveau *cyp19a1b* pendant la différenciation sexuelle (Vizziano-Cantonnet et al., 2011).

En effet, les œstrogènes régulent la transcription du gène de l'aromatase du cerveau *cyp19a1b* en se liant et en activant les récepteurs d'œstrogènes puis aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) situés sur le promoteur de *cyp19a1b* (Chang et al., 2005; Diotel et al., 2010).

L'aromatase du cerveau est exprimée pendant la différenciation de la gonade, de manière faible, dans la gonade mâle comme dans la gonade femelle et n'a pas encore été décrite comme étant variable en fonction du sexe chez le poisson zèbre (Kallivretaki et al., 2007). De plus chez le tilapia du Nil et le fugu japonais (Sudhakumari et al., 2003, 2005 ; Rashid et al., 2007) le gène *cyp19a1b* est également exprimé tôt pendant le développement du testicule et a induit une inversion sexuelle de femelle à mâle lors de traitement aux androgènes chez le tilapia. Cependant, les implications de l'expression précoce de *cyp19a1b* dans le testicule en développement ne sont pas encore connues

## ***Foxl2***

*Foxl2* (forkhead box L2) est un facteur de transcription et un marqueur de la différenciation ovarienne chez les vertébrés. Il est également impliqué dans les fonctions ovariennes chez les femelles adultes. L'expression de *foxl2* est conservée dans les stades précoces de la différenciation ovarienne chez plusieurs vertébrés tels que les poissons (Baron et al. 2005; Liu et al., 2007); les mammifères et les reptiles (Loffler et al. 2003), les oiseaux (Loffler et al. 2003; Govoroun et al. 2004), particulièrement dans les cellules de la granulosa en différenciation. *Foxl2* pourrait agir en synergie avec le gène de l'aromatase gonadique (Loffler et al., 2003; Govoroun et al., 2004; Liu et al., 2007). En effet *foxl2* régule l'expression de *cyp19a1a* chez le carreau hirame (Wang et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007) le medaka (Nakamoto et al., 2007) mais également chez le tilapia du Nil (Poonlaphdecha et al., 2013).

Chez le tilapia du Nil et le medaka, l'expression de *foxl2* est d'abord détectée dans les cellules somatiques autour des cellules germinales dans les gonades qui ont entamé une différenciation ovarienne puis dans les cellules de la granulosa pendant tout le développement ovarien, principalement au niveau des follicules pré-vitellogéniques et vitellogéniques (Wang et al., 2004 ; Nakamoto et al., 2006). Chez la truite arc-en-ciel, deux gènes ont été clonés, *foxl2a* et *foxl2b*. Chez le carreau hirame *Paralichthys olivaceus*, les expressions de *foxl2* et du récepteur de l'hormone de stimulation folliculaire *fshr* sont supprimées par les fortes températures tôt pendant la différenciation sexuelle (Yamaguchi et al., 2007). Chez les mammifères il a été démontré que *fsh* stimule la biosynthèse des œstrogènes par régulation de la transcription du gène de l'aromatase (Dorrington et al., 1975; Fitzpatrick et al., 1991). Récemment, il a été démontré chez le carreau hirame (*Paralichthys olivaceus*) que le stress thermique inhibe l'expression de *fsh* dans les cellules de la granulosa, conduisant donc à la réduction de l'activité de l'aromatase (Shirmizu et al., 2005). De plus chez le tilapia du Nil, les fortes températures entraînent une diminution de l'expression de *foxl2* parallèlement à celle de l'aromatase gonadique *cyp19a1a* mais est fortement exprimée pendant la différenciation ovarienne des femelles XX (Poonlaphdecha et al., 2013).

## ***Igf1***

Le facteur de croissance, *Insulin-like growth factor 1 (Igf1)*, est très impliqué dans la régulation de la croissance (Macqueen et al., 2011), la différenciation sexuelle et la reproduction (Reinecke & Collet 1998; Reinecke et al., 2005) mais également dans la mitogenèse et l'arrêt de l'apoptose (Yamamoto et al., 2011 ; Reindl & Sheridan, 2012). Les transcrits et / ou peptides d'*Igf1* sont présents chez la truite arc-en-ciel, le tilapia et le bar dans les spermatogonies, les spermatocytes, les cellules de Sertoli et de Leydig (Berishvili et al., 2006; Shved et al., 2007; Vinas & Piferrer, 2008), suggérant des fonctions autocrines / paracrines de l'*Igf1*. Chez le tilapia du Nil, *Igf1* est soupçonné d'avoir un fort impact sur le développement des gonades chez les femelles comme chez les mâles. Les transcrits de *Igf1* sont détectés dans les cellules somatiques de la gonade des mâles et des femelles de 7 à 9 jpf, âge auquel la gonade est encore non différenciée. Chez les femelles *Igf1* est détecté dans les cellules germinales à 29 jpf, âge correspondant à la mise en place de la première méiose ovarienne (Berishvili et al., 2006) et n'est mis en évidence que plus tardivement chez les mâles entre 51 et 53 jpf, dans les cellules germinales, mais c'est à cet âge que survient le début de la méiose dans les testicules. En conséquence, la production de *Igf1* dans les cellules germinales pourrait être liée à la mise en place de la méiose chez le tilapia du Nil.

Par ailleurs l'expression de *Igf1* et la croissance chez plusieurs poissons est positivement corrélée (Beckman, 2011; Yamamoto et al., 2011 ; Fuentes et al., 2013). En effet chez les poissons, *Igf1* est le principal régulateur de la croissance musculaire (Macqueen et al., 2011; Fuentes et al., 2013).

## **Les récepteurs des androgènes (ARs) et des œstrogènes (ERs)**

S'il est communément admis que les stéroïdes sexuels jouent un rôle important dans la différenciation, le développement et la fonction de la gonade (Callard et al., 2001; Menuet et al., 2002; Kitano et al., 2012; Nelson & Habibi, 2013), leur sécrétion et leur action sont fortement régulées à la fois par la présence des récepteurs (ERs pour récepteurs d'œstrogènes, et ARs pour récepteurs d'androgènes) mais aussi des éléments de réponse (ERE, Estrogen responsive elements; ARE androgen responsive elements) sur le promoteur ou en absence de ligands sont plus généralement dans le cytoplasme. De plus, la nature de

leur action (génomique et /ou non génomique voir revue Thomas, 2012) leur confère des propriétés particulières selon le gène cible ou la protéine spécifique (Paris et al., 2008; Venken et al., 2008; Nagler et al., 2010). Les œstrogènes endogènes viennent d'une conversion des androgènes en œstrogènes, favorisée par l'aromatase. Toute tentative de contrôle des flux de stéroïdes devrait être plus efficace à travers le suivi de ce mécanisme facilité donc par la surveillance de l'expression des récepteurs d'œstrogènes.

Trois récepteurs d'œstrogènes *esr1* (*era*), *esr2a*, et *esr2b* (*erb*) ont été caractérisés chez les poissons téléostéens (Hawkins et al., 2000). De même, deux isoformes de récepteurs d'androgènes *ara* et *arb* ont été caractérisées chez plusieurs espèces de poissons dont le tilapia (Hong et al., 1996; Todo et al., 1999; Blazquez & Piferrer, 2005).

Malgré l'importance des ERs dans la différenciation ovarienne, tous les ERs étaient exprimés de façon similaire chez les tilapias mâles comme femelles pendant la différenciation de la gonade (Ijiri et al., 2008). De même, les profils d'expression des deux récepteurs d'androgène *ara* et *arb* n'étaient pas dimorphiques mais étaient faibles comparativement aux niveaux d'expression des ERs (Ijiri et al., 2008).

Chez la truite arc-en-ciel les expressions des gènes *esr1*, *esr2a*, et *esr2b* augmentent dans les cerveaux des mâles dans la même proportion que l'expression et l'activité du gène de l'aromatase du cerveau *cyp19a1b* pendant la différenciation sexuelle mais l'expression dimorphique se dissipe après cette période (Vizziano-Cantonnet et al., 2011).

Chez le medaka par contre, les expressions des ERs et des ARs étaient spécifiques aux femelles dans le cerveau mais *esr2b* était plus élevée chez les femelles tandis que *esr2a* devenait élevée chez les mâles pendant la saison de reproduction (Hiraki et al., 2012).

A la différence de ce qui se passe chez les Mammifères et les oiseaux, *esr1* était spécifique au sexe male, laissant penser ainsi que ce gène aurait un rôle dans la masculinisation ou la déféminisation chez le medaka tout comme *esr2b* et *arb* pour la féminisation ou la démasculinisation (Hiraki et al., 2012). De plus une activation spécifique aux femelles des sites de AR et de ER a lieu sous traitement avec E2 mais l'effet contraire ou une diminution de leurs expressions est observée sous traitement avec 11KT (Hiraki et al., 2012).

Chez le tilapia *O. mossambicus* on observe une augmentation de l'expression de *era* et de *erb* proportionnellement au taux de mâles sous traitement à fortes températures (32°C) tandis que les niveaux d'expression diminuaient en corrélation avec l'augmentation du taux de femelles sous température féminisante, 20°C (Wang & Tsai, 2000 ; Tsai et al., 2003). De même chez le pejerrey dont le sexe est déterminé par la température, l'expression de

l'aromatase du cerveau *cyp19a1b* augmente en condition de température masculinisante parallèlement à l'expression de *erb* tandis qu'une diminution significative et parallèle de *cyp19a1b* et de *era* a lieu dans les deux sexes lorsque les poissons adultes subissent un traitement à l'estradiol (Strobl-Mazzulla et al., 2008).

### Organisation de la recherche

Le travail de recherche est divisé en quatre étapes :

- La première étape a consisté à produire le matériel biologique adapté aux objectifs fixés, soit un lot de femelles XX devant être exposés aux trois traitements masculinisants, et un lot témoin de femelles XX, et un lot témoin de mâles XY, tous ces lots ayant la même origine maternelle. Plus particulièrement, il s'agissait de créer des conditions favorables à la synchronisation de géniteurs femelles (XX) afin de pouvoir disposer d'un pool d'ovules de plusieurs femelles et de le fertiliser avec des pools de sperme de plusieurs mâles (XX et YY), selon le génotype recherché
- La deuxième étape a consisté à déterminer à partir de quelle taille minimale le tilapia du Nil pouvait être marqué individuellement avec des transpondeurs électroniques (RFID et Small PIT-tags), sans que cela n'affecte ni la survie, ni la croissance. Cette étude préliminaire devait permettre de parer à toute éventualité de croissance lors de l'étape 3, et de choisir le type de marques les plus adaptées à la taille des poissons en fin de traitement, préalablement à leur élevage en « *common garden* ».
- La troisième étape qui s'est appuyée sur les résultats des deux premières a été l'évaluation des performances de croissance des mâles issus des traitements masculinisants par rapport aux mâles et aux femelles génétiques, et cela dans un même environnement d'élevage. L'étude, d'une durée de 6 mois s'est attachée aux caractères d'intérêt zootechnique comme la survie, la croissance et la morphologie (rapport hauteur / longueur, susceptible d'influencer le rendement au filetage).
- La dernière étape est consacrée aux analyses en biologie moléculaire. Cette étape a permis de comparer les profils d'expressions de gènes-clés depuis la période de la différenciation sexuelle jusqu'au stade juvénile chez les individus génétiquement femelles et mâles, et chez les individus ayant été exposés aux trois traitements masculinisants. L'analyse des profils d'expression a eu lieu à la fois dans le système nerveux central et dans les gonades.



**Production du matériel biologique  
recherché : Synchronisation des femelles  
et plans de croisements**

**Chapitre**

---

**1**



Le contrôle de la reproduction en captivité est essentiel pour la durabilité et la rentabilité en aquaculture. La reproduction des poissons peut être influencée par de nombreux facteurs de l'environnement, notamment la température de l'eau, la photopériode, la luminosité, les facteurs sociaux (densité, sexe-ratio) et le substrat sur lequel les œufs sont pondus (Wohlfarth & Hulata, 1983; Baroiller et al., 1995a; Brummett, 1995; Duponchelle et al., 1998; Taranger et al., 2010; Huertas et al., 2014).

Tout comme chez les autres vertébrés, le cycle de reproduction chez les poissons est séparé en deux grandes phases (Mylonas et al., 2010). La prolifération, la croissance et la différenciation des gamètes constitue la première phase (spermatogenèse et vitellogenèse), tandis que la maturation et la préparation à la libération des gamètes et à l'insémination constituent la seconde phase. A quelques exceptions près, notamment chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* (van Ginneken & Maes, 2005), la spermatogenèse et la vitellogenèse chez les poissons en élevage ne posent que peu de problèmes en conditions correctes d'élevage (Buchet et al., 2008; Okumura et al., 2003). Le problème le plus fréquemment rencontré en élevage se pose chez les femelles et concerne l'absence de maturation finale des oocytes, d'ovulation et de frai (Billard, 1989 ; Berlinsky et al., 1997; Vermeirsen et al., 1998, 2000 ; Mylonas et al., 2001, 2004a, b).

La testostérone est produite par les cellules de thèque autour des follicules sous stimulation gonadotrope et a un effet positif sur l'hypophyse (Nagahama et al., 1995). Les stéroïdes sexuels ont un rôle important dans la maturation et l'ovulation. La testostérone est un précurseur de l'E2, laquelle est produite dans les cellules de la granulosa, et favorisent la croissance des oocytes à travers la stimulation de la synthèse et la sécrétion de la vitellogénine et des protéines de l'enveloppe de l'œuf dans le foie (Nagahama et al., 1995 ; Lubzens et al., 2010). La présence de plusieurs gènes vitellogéniques a été démontrée chez plusieurs téléostéens (Hiramatsu et al., 2006; Sawaguchi et al., 2006 ; Finn, 2007). Après la croissance des oocytes, un changement de la stéroïdogénèse conduisant à la production de la 17,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one (17,20 $\beta$ -P) dans les cellules de la granulosa permet la reprise de la méiose et la maturation finale de l'oocyte (Nagahama et al., 1997 ; Senthilkumaran et al., 2004 ; Zapater et al., 2012). Chez les femelles à pontes asynchrones comme le tilapia du Nil, un rôle de la FSH et la LH sur la vitellogenèse a été relevé (Rosenfeld et al., 2007), en raison non seulement de l'augmentation des transcrits de la FSH $\beta$  et de la LH $\beta$  pendant la croissance ovarienne mais aussi du contrôle gonadotrope de la



vitellogenèse, principalement basé sur la synthèse folliculaire de E2 (Kobayashi et al., 2008; Molès et al., 2008). De plus un rôle spécifique de FSH sur l'activité et l'expression des transcrits de l'aromatase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de E2, a été démontré (Montserrat et al., 2004). Par ailleurs, FSH stimule l'incorporation de la vitellogénine dans les follicules (Jalabert, 2005; Hiramatsu et al., 2006).

La photopériode et l'intensité de l'éclairement sont parmi les facteurs les plus importants pour la synchronisation de la maturité sexuelle et de la reproduction chez les poissons (Duston & Bromage, 1988; Randall et al., 1998; Bromage et al., 2001; Duston et al., 2003; Ikegami et al., 2014), y compris chez des espèces tropicales comme le tilapia du Nil (Duponchelle et al., 1998; Campos-Mendoza et al., 2004; Biswas et al., 2005). La maturation et la périodicité des pontes dépendent aussi de la température de l'eau. En dehors de la gamme de températures dites physiologiques, la qualité des descendances peut être affectée ou la ponte peut ne pas survenir. Ainsi, chez l'omble chevalier *Salvelinus alpinus*, qui pond à de faibles températures, une inhibition de la dopamine sur la sécrétion de LH peut avoir lieu dès 10°C (Gillet et al., 1996). Une température élevée peut également retarder la réponse ovarienne chez la truite arc-en-ciel (Pankhurst & Thomas, 1998). Il est connu que la température influence le niveau de stéroïdes à travers une modulation de l'activité de l'aromatase liée à la synthèse de l'œstradiol (Kime, 1979; D'Cotta et al., 2001a; Baroiller et al., 2009a). L'absence d'œstradiol entraîne la réduction de la production de vitellogénine (Specker & Sullivan, 1994) qui constitue une grande partie du volume des oocytes (Tyler & Sumper, 1996). Par contre chez les espèces qui se reproduisent dans des eaux plus chaudes, la ponte peut être affectée par les faibles températures (Drori et al., 1994 ; Cerdá et al., 1996). Ainsi chez le tilapia du Nil, la reproduction peut s'arrêter en-dessous de 22°C (Wohlfarth & Hulata, 1983; Charo-Karisa et al., 2005).

La densité de peuplement entraîne une diminution considérable et parfois une suppression des taux circulants de stéroïdes dans le plasma (Coward et al., 1998), alors que ces stéroïdes sont nécessaires à la reprise de la méiose et donc à la reproduction. De plus du fait de l'existence d'effets comportementaux, il n'est pas possible pour les mâles d'établir et de défendre une arène de ponte si la densité est excessive. En effet, l'élévation de la densité de peuplement s'accompagne donc souvent, chez des espèces territoriales comme le tilapia du Nil, d'une inhibition physiologique ou comportementale de la reproduction (Coche, 1982; Tsadik & Bart, 2007). En contexte expérimental, la variation du nombre d'individus dans le même espace vital est donc susceptible de réprimer / déréprimer la reproduction, et constitue un troisième levier permettant de synchroniser les cycles de reproduction des géniteurs femelles.

L'utilisation des phéromones pour le contrôle de la physiologie de la reproduction et du comportement a été démontrée chez plusieurs espèces de poissons (Chung-Davidson et al., 2011; Stacey, 2011; Stacey & Sorensen, 2005). La réponse à l'effet des phéromones peut se passer à plusieurs niveaux, allant du comportement (Stacey et al., 1989) à la synthèse et au métabolisme des stéroïdes (Scott et al., 1994 ; Bayunova et al., 2011 ; Huertas et al., 2014). Chez le tilapia du Nil, la libération de phéromones dans les urines peut influencer la ponte des femelles (Barata et al., 2008). En effet, chez cette espèce, la libération d'urine par le mâle indique son statut dans la hiérarchie de dominance et est informative pour les mâles comme pour les femelles (Almeida et al., 2005 ; Barata et al., 2007 ; Barata et al., 2008). Chez des femelles en pré-ovulation, on observe, suite à l'exposition à de l'eau contenant de l'urine de mâles, une augmentation de la synthèse de 17,20 $\beta$ -P, dont la fonction la plus connue est l'induction de la maturation des oocytes, la reprise de la méiose et l'éclatement de la vésicule germinale dans les oocytes juste avant l'ovulation (Nagahama et al., 1987; Pankhurst, 2008). Cette modification des profils hormonaux indique que l'exposition aux urines de mâles a un effet stimulant sur la maturation oocytaire finale (Huertas et al., 2014). De plus, la 17,20 $\beta$ -P favorise le développement des follicules ovariens primaires sous la stimulation de la FSH (Zapater et al., 2012). Les ovaires des tilapias du Nil sont asynchrones, avec des lots d'oocytes en cycle complet environ toutes les 2 semaines (Tacon et al., 1996 ; Miranda et al., 2005). En corollaire, l'exposition aux urines de mâles peut agir non seulement pour la synchronisation de la maturation ovocytaire finale et de l'ovulation, de même que pour synchroniser la maturation de nouveaux lots d'oocytes (Huertas et al., 2014).

L'objectif de cette étude était d'obtenir, grâce à un contrôle environnemental, une synchronisation de la maturation ovocytaire finale et de l'ovulation de plusieurs géniteurs femelles du tilapia du Nil, de manière à disposer d'un pool d'ovules quantitativement suffisant et homogène en vue de la production de 5 lots de poissons requis par l'expérience principale de cette thèse.

## Matériel et méthodes

### *Matériel biologique et conditions d'élevage*

Tous les géniteurs sont de la souche Manzala venant des élevages de l'Université de Liège (Belgique). Comme son nom l'indique, la souche Manzala provient du lac Manzala au Nord du delta du Nil. La lignée utilisée avait d'abord été domestiquée à l'université de Sterling en Grande Bretagne dans les années 70 avant d'être transférée à Tihange en Belgique. La bonne variabilité génétique des géniteurs a été confirmée par l'étude des marqueurs microsatellites (Dia, 2013). Les géniteurs mâles XX et YY ont été produits par inversion hormonale du sexe et leurs génotypes (XX ou YY) ont été confirmés par des tests du sexe-ratio de leurs descendance suite à des croisements avec des femelles XX (Charles Mélard, Univ. Liège, communication personnelle), selon la méthode décrite par Baroiller et al. (1989) et Scott et al. (1989). Au total 10 femelles XX, 3 mâles XX et 3 mâles YY adultes de tilapia *O. niloticus* ont été utilisés. Chaque individu était identifié par marquage à l'aide d'une puce électronique (PIT-tag). Les 10 femelles XX de poids moyen 177,2 g, après avoir été anesthésiées à l'aide de l'eugenol 0.05ml/L d'eau, ont été initialement strippées puis regrougées dans un aquarium de 250 L en circuit fermé thermorégulé. Les poissons ont été placés à une densité de 10 femelles.m<sup>-2</sup> (Tsadik & Bart, 2007), dans l'aquarium, lequel a été couvert d'une bâche en plastique opaque, afin de réduire autant que possible la luminosité extérieure. La photopériode était de 6h d'éclairage : 6h d'obscurité et la température a été diminuée de 27 à 20°C à raison de 2°C par heure et maintenue à cette valeur pendant 4 semaines. Pendant cette période, les poissons étaient nourris *ad libitum* une fois par jour avec un aliment (protéines 50%, lipides 10%).

### *Remise en conditions favorables à la vitellogenèse*

Après 4 semaines d'élevage en conditions défavorables à la vitellogenèse, les poissons ont été remis en conditions favorables, i.e. une photopériode de 12 h d'éclairage : 12 h d'obscurité, une température de l'eau de 27°C, et une densité plus faible. Ainsi, 2 femelles et 1 mâle ont été placés dans un aquarium de 250 L subdivisé en 3 compartiments contenant chacun un seul individu, permettant la circulation de l'eau d'un compartiment à l'autre mais

aussi aux poissons de se voir ; en revanche, ils étaient incapables de passer d'un compartiment à un autre. Ce principe a été répliqué 5 fois (10 femelles, 5 aquariums). Chaque aquarium était structuré de sorte que l'eau passe d'abord du compartiment du mâle avant de traverser les 2 autres compartiments dans lesquels étaient les femelles placées individuellement. Sur de courtes périodes, l'isolement était levé et on permettait aux femelles d'être en contact du mâle dans l'aquarium. Deux fois par semaine, un pool d'urines de mâles, gardés sous 12 h d'éclairage : 12 h d'obscurité, était déversé dans les aquariums utilisés pour la reprise de la vitellogenèse.

### *Fécondation artificielle et production des descendances*

Les femelles étaient observées quotidiennement afin de repérer des signes précurseurs de la reproduction, comme une papille gonflée, des parades reproductrices et le nettoyage du fond de l'aquarium.

Avant de « stripper » les femelles montrant une ponte imminente, les mâles au génotype recherché étaient d'abord anesthésiés avec de l'eugenol à 0.05ml/L. La laitance des mâles anesthésiés était alors soigneusement collectée à l'aide d'une seringue dans laquelle était contenu du liquide physiologique (Tris 2,42 g, glycine 3,75 g, NaCl 5,52 g, KCl 2,00 g), de manière à éviter une activation involontaire du sperme, dans le cas où de l'urine aurait été involontairement collectée en même temps (l'activation des spermatozoïdes est fonction de la pression osmotique, donc inhibée dans une solution de pression osmotique comparable à la valeur intratesticulaire). La seringue contenant le mélange liquide physiologique-sperme est alors placée, soit dans de la glace ou dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation. Les femelles présentant les signes précurseurs d'une ponte imminente sont alors « strippées » en exerçant une pression douce sur l'abdomen de l'avant vers l'arrière. Les ovules sont recueillis dans une boîte de Petri et immédiatement fertilisés par le pool de sperme contenu dans les seringues. Lors de l'expérience réalisée lors de cette étude, approximativement 80% du pool d'œufs de femelles XX ont été fertilisés avec un pool de spermes de mâles XX, pour constituer les lots qui subiront les 3 méthodes de masculinisation et le lot témoin de femelles XX. Le reste du pool d'œufs, environ 20%, a été fertilisé avec un pool de spermes de mâles YY pour constituer le lot témoin de mâles génétiques XY.

Après ajout de quelques gouttes d'eau à 27°C au mélange œufs – sperme, l'ensemble était doucement secoué par rotation de la boîte de Petri pendant environ 1 minute afin

d'homogénéiser le mélange, et ensuite déposé pendant environ 3 minutes afin de permettre la fécondation.

Les œufs fécondés sont ensuite placés dans des incubateurs à 27°C où un léger courant d'eau assure le brassage permanent des œufs. Les œufs non fécondés sont siphonnés, périodiquement. A l'âge de 10 jours post-fécondation (jpf), les lots d'œufs fertilisés avec un pool de spermatozoïdes de mâles XX sont subdivisés au hasard en 4 sous-groupes dont 3 subiront les traitements masculinisants pendant 30 jours.

## **Résultats**

Tous les poissons ont survécu pendant la période d'arrêt de la maturation des oocytes.

Seize jours après la remise en conditions favorables à la maturation d'oocytes, deux lots de femelles synchrones ont été relevés. 7 femelles d'une part et 3 autres femelles d'autre part avec 1 jour de décalage entre les deux lots. Les premiers ovules recueillis après la remise en conditions favorables à la maturation d'ovocytes étaient de formes irrégulières, de mauvaise qualité, certains étaient blanchâtres et surnageants. Chaque femelle avait au moins 1000 ovules à la première collecte d'ovules.

Pendant la collecte des œufs, seuls les œufs bien formés et bien matures étaient gardés pour être fertilisés et constituer les 5 lots de traitements. Cependant, la toute première reproduction artificielle a eu des taux de fécondation assez faibles, plus de 50% des œufs n'étaient pas viables après quelques heures à 1 jour après fertilisation. De plus, sur le reste d'œufs viables, les embryons étaient malformés. Le nombre et la qualité des œufs se sont nettement améliorés dès la constitution du second pool d'œufs pour la fécondation artificielle.

L'objectif était d'avoir un nombre minimum de 250 larves par traitement de sorte à en disposer d'un nombre suffisant pour le sexage final après les échantillonnages pour les besoins de travaux en biologie moléculaire. Par conséquent, un nombre minimum de 3 œufs devait être constitué à partir d'un pool d'ovules venant de 3 femelles au moins. Cela permettait de disposer d'assez de larves compte tenu de la mortalité pendant la phase embryonnaire et / ou de la proportion d'œufs non fécondés.

## Discussion

Les objectifs de l'expérience n'étaient pas de tester la synchronisation des femelles mais de s'assurer, en adoptant les conditions établies par différentes études, de réaliser une synchronisation de plusieurs femelles afin de disposer d'un nombre de larves suffisant pour les besoins de la masculinisation par les 3 méthodes considérées mais aussi de disposer de lots témoins constitués de femelles et de mâles génétiques. Et cela à partir d'un plan de croisement utilisant un même et unique pool d'œufs de départ.

Les résultats obtenus dans la présente étude attestent de l'arrêt de la maturation chez les femelles. Biswas et al. (2005) avaient également observé chez le tilapia du Nil une arrêt de la reproduction dès la 3<sup>e</sup> fertilisation d'ovules provenant de femelles de plus de 300g de poids moyen exposés à une photopériode de 6 : 6, parallèlement à une diminution sévère des taux circulant d'œstradiol dans le plasma chez ces femelles. En effet dans cette dernière étude, la réduction des taux circulants d'œstradiol est accompagnée d'une augmentation des taux de testostérone, traduisant ainsi une possible réduction de l'activité de l'aromatase (Lamba et al., 1983; Winkler & Wade, 1998). Il est bien connu que l'absence d'œstradiol entraîne la réduction de la production de vitellogénine (Specker & Sullivan, 1994) qui constitue la principale composante en volume des oocytes (Tyler & Sumper, 1996). Des résultats similaires avaient aussi été atteints dans des études de synchronisation de la maturation sexuelle et de la reproduction chez les poissons (Bromage et al., 2001).

Les ovaires du tilapia sont asynchrones avec des lots d'oocytes qui entrent en cycle complet à peu près chaque 2 semaines (Miranda et al., 2005).

L'entrée en maturation des oocytes observée chez plusieurs femelles en même temps atteste d'une synchronisation de la reproduction par induction de la maturation finale des oocytes chez les femelles remises en conditions favorables. Des résultats similaires ont été observés chez le tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus* chez lesquels l'exposition aux urines de mâles a entraîné une augmentation de la production de 17,20  $\beta$  dihydroxypregn-4-en-3-one (Huertas et al., 2014), un stéroïde impliqué dans le développement des follicules ovariens et soupçonné de jouer également un rôle dans la sécrétion de *fsh* (Zapater et al., 2012). En effet, l'initiation de la vitellogenèse est caractérisée par une augmentation dans le plasma de *fsh* et de l'œstradiol, mais aussi d'une augmentation dans les ovaires des récepteurs de *fsh* (*fshr*) (Kobayashi et al., 2008, 2009). De plus des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la fin de la vitellogenèse et la reprise de la méiose donc la maturation des

ovocytes se traduit par une augmentation dans le plasma de *lh* et des récepteurs de *lh* (*lhr*) qui initiera la production du stéroïde de maturation 17,20  $\beta$  dihydroxypregn-4-en-3-one (Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010). La présente étude a été la première pendant laquelle les facteurs température, photopériode, densité, et l'utilisation d'urines de mâles ont été testé tous ensemble en même temps. Ce qui pourrait expliquer les meilleurs taux de synchronisation obtenus dans la présente étude. Un dosage des taux circulant de stéroïdes et de suivi de la croissance des femelles aurait apporté de précieuses informations additionnelles. Par ailleurs une évaluation de la compétition entre spermes dans le pool pour la fécondation *in vitro* fournirait des informations utiles sur la traçabilité des descendance.



1ère partie:  
**Micro-tagging of Nile tilapia with Small  
Electronic Tags and Estimation of Body  
Weight by Image Analysis**

**Chapitre**  
**2**

Ouedraogo C.  
de Verdal H.  
Canonne M.  
D'Cotta H.  
Baroiller J.F.  
Baras E.

*Full paper ISTA 10 , Jerusalem Israël 2013*





## Abstract

The measurement of fish wet body mass (WM) is crucial in growth studies, but more difficult or more stressful in small fish than obtaining information on their body dimensions, which can be achieved accurately and with a minimal level of stress from digital photographic methods. Here, we provide evidence that WM can be accurately ( $R^2$  of 0.95) estimated in small (10-25 mg) Nile tilapia, on the basis of their body surface and body contour on digital photographs of fish in profile view.

Likewise, the individual identification of fish is often desirable from the youngest age or smallest size. It can be achieved repeatedly, rapidly and at low cost with electronic tags, but the sizes below which the tagging protocol or tag presence interferes with growth should be determined. Small PIT-tags (8 x 1.4 mm, 32 mg) were evaluated over 11 days (measurements at 3, 7 and 11 days after tagging) in siblings of different sizes (700-2500 mg), producing six categories of added weight in air (4.5, 3.3, 2.5, 2.0, 1.7 and 1.4%). The same categories of added weight were used for RFID-tags (6 x 1 mm, 10 mg) in fish ranging from 200 to 700 mg. For each type of tag and category of added weight, it was tested whether the effect of tagging came from surgery, tag insertion or tag presence. In synthesis, short-term effects of surgery and tag presence were restricted to tag ratios  $\geq 2.5\%$  WM. Mid-term (5-week) evaluations of tag retention and fish survival revealed no negative tag effect in fish just below this ratio. For smaller fish (<400 mg for RFID-tags, < 1200 mg for small PIT-tags), negative impacts on growth should be expected during the week after tagging.

Key words: tagging, Tilapia, image analysis, PIT-tag, RFID

## Introduction

The individual identification of animals at the smallest possible size or youngest age becomes of increasing interest for elucidating many biological issues. Individual identification can be achieved with genetic markers as microsatellites (Herbinger et al., 1995, Carleton et al., 2002), provided that enough tissue can be collected and that tissue removal is not excessively harmful to the fish, if it matters that the fish under study survives. Genetic markers can be extremely performing, but their use is relatively expensive and not always practical, when rapid and repeated identification is needed, as typically happens during mark-recapture studies in the wild or growth experiments in experimental environments (Gharrett and Seeb,

1990; Skalski et al., 2009). The use of extrinsic marks or tags does remain tremendously useful in many contexts.

Among the tags available for the individual identification of small fish (sequential coded wire tags; Jefferts et al., 1963; VI tags, Haw et al., 1990 and passive integrated transponders, PIT-tags, Prentice et al., 1990), the latter category is often preferred for many reasons (reviews in Lucas and Baras, 2000; Skalski et al., 2009): short tagging time, billions of available tag codes, rapid and reliable code reading, possibilities of automatic remote detection, internal placement, with no postural disequilibrium or modification of the fish external aspect, and very high retention rate, often close to 100% (e.g. Baras et al., 2000; Bolland et al., 2009; Ficke et al., 2012).

Standard PIT-tags are small (about 11 mm in length, 2 mm in diameter and 100 mg in mass), but nevertheless face some size limitations, which refer to the size of the body cavity for implantation, and added weight, which should not exceed some proportion of the fish mass, as electronic tags are systematically denser than water. In view of the volume and adjustment capacity of the swim bladder in fishes (Alexander, 1966), the added load (i.e. weight of the tag in the water, thus its weight in air minus its volume) should not exceed 1.75% of the fish body mass (corresponding ratio for tag's weight in air of about 3%), otherwise the buoyancy of tagged fish can be compromised. Owing to a precaution principle, it is generally recommended to use tag ratios in air no higher than 2% (Winter, 1983). In most feasibility studies, it was indeed found that tag ratios exceeding these thresholds resulted in higher mortality, reduced growth, altered behaviour or lower tag retention rates (Baras et al., 1999, 2000; Navarro et al., 2006; Tatara, 2009; Kaemingk et al., 2011). For standard PIT-tags, this gives a recommended fish mass of about 5 g and a minimal fish mass of about 3-4 g.

Recently, two new types of tags have been developed: small PIT-tags (about 30 mg) and RFID-tags (about 10 mg), which have been successfully used in very small animals like ants (Moreau et al., 2011), bees (Decourtye et al., 2011) and zebrafish *Danio rerio* (Cousin et al., 2012). Can the size limits for implanting confidently these tags in small fish be transposed from the aforementioned physiological constraints, or are these limits further dependent upon the difficulty of handling and tagging very small fish?

Another issue in the growth studies of very small fish refers to the innocuousness of the weighing protocol, which requires removal of excess water on blotting paper or filter. There has been very little detailed information on the impact of this protocol on fish survival, growth or behaviour, but increasing evidence that it can be harmful to larvae or very small juveniles (e.g. Krejszeff et al., 2013). Alternatively, fish mass can be inferred from digital

photographs after the calculation of mass-to-length relationship or more elaborate modelling of fish body shape in the species of interest, as it was shown in adult European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Costa et al., 2013). However, the accuracy of these predictions is often limited because of variable condition factors among individual fish, and is further complicated in early life stages, which frequently exhibit strongly allometric growth patterns.

The present study provides a series of experiments on the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, which aimed at a) testing whether fish body mass can be predicted with a greater accuracy from digital photographs by measuring other dimensions than body length only; and b) testing the effects of small PIT-tags and RFID-tags on growth, survival and tag retention in small tilapia of variable sizes, in order to determine the minimal body size for tagging them with electronic tags.

## **Material and Methods**

The fish used in this study were obtained from the spontaneous reproduction of captive broodfish in the experimental infrastructures of GAMET (Groupe d'Aquaculture continentale Méditerranéenne et Tropicale, Montpellier France). Until the start of any experiment, the fish were raised in 50-L (45 x 35 x 32 [h] cm) tanks in indoor recirculating water systems at 28°C under 12L:12D and fed the same formulated diets as during the experiments. In the tagging study, all fish originated from a single progeny (*O. niloticus cancellatus*, originating from Lake Hora, Ethiopia). The use of full siblings was preferred because of strong family-effects on growth and aggressiveness in Nile tilapia. In the biometric study, fish were also siblings, from the Manzala population (Egypt).

### **Biometric study**

The experiment for estimating the fish wet body mass (WM) from digital photographs was conducted on small (10-25 mg, N=93) sibling Nile tilapia aged 14 daf (days after fertilization). One hundred fish were anaesthetised (tricaine, 70 mg L<sup>-1</sup>), dried carefully on blotting paper, weighed (nearest 0.1 mg) and photographed in profile view using a fixed Canon EOS 1100D digital camera (12.2 Mpixel), by reference to a graduated scale. Seven

fish did not survive handling and were not taken into account in any analysis. The following body dimensions were later measured on the computer, using the freeware Image J (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>; developed by Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD): standard body length SL, maximal body depth BD, body contour (BC), excluding fins, and body surface BS, excluding fins as well. All four dimensions are given straight by the freeware once the fish body has been contoured automatically, which is feasible if it exhibits enough contrast with the background.

### Tagging study

The tags used in the study were 13.56 MHz RFID glass microtags (Nanotec RFID, Lutronic International, Rodange, Luxembourg, [www.nanotec.net](http://www.nanotec.net); 6 mm in length, 1 mm in diameter, mass of 10mg), and small 134.2 kHz FDX PIT-tags (RealTrace, Villebon-sur-Yvette, France, [www.realtrace.com](http://www.realtrace.com); 8.5 mm length, 1.4 mm in diameter, mass of 32mg; Figure 1.A).

All fish to be tagged were anaesthetised (Eugenol, 0.1ml.L<sup>-1</sup>), weighed (nearest 0.1mg), then placed in lateral recumbence onto soaked paper for surgery. Thereafter, the right flank of the fish was punctured with a sterile syringe needle (23 gauge for RFID-tags and 21 gauge for PIT-tags) about 2-3mm cranial to the anus and 2-3mm off the midventral line (Figure 1.B). The tag was sterilised with 95% ethanol, rinsed with a physiological saline solution, inserted into the body cavity with fine dissection forceps, then gently pushed entirely inside with the fingertip (Figure 1.C). The entire protocol (including anaesthesia) always required less than 3 minutes per fish, of which no more than 15 seconds for tagging. The fish was then returned to anaesthetic-free water at room temperature (26-28°C) until full recovery of balance and spontaneous swimming (always < 2 minutes). Surgery success can be strongly dependent on the surgeon's experience (Wagner and Cooke 2005; Skalski et al. 2009), so tagging was performed by the same surgeon throughout.

For each type of tag, fish belonging to six different size categories were considered, so as to produce six tag ratios (i.e. tag mass to fish mass ratio in the air) of 5.0, 3.3, 2.5, 2.0, 1.7 and 1.4 %. The corresponding size categories were 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg for RFID-tags and 700, 1000, 1300, 1700, 2000 and 2500mg for PIT-tags (Table 3). No smaller fish were evaluated, because the tag's length would have been excessively long relative to the dimensions of the body cavity. As fish were siblings, it was impossible to conduct all

experiments at the same time. Henceforth, the entire study period extended over about 50 days.

For each size category, 10 fish were assigned to each of the four following treatments: 1) tagged fish (as above); 2) sham implanted fish ( i.e. with the tag inserted into the body cavity over half % of its length, and then removed; 3) fish only punctured with the sterile needle, and 4) control fish, anaesthetised, handled and weighed only. These four groups are designated as T, S, P and C, for tagged, sham, puncture and control, respectively. For every size categories, the study extended over no more than 11 days, because young fish can heal their wounds rapidly (Jepsen et al., 2002), and most adverse effects of surgical tagging or tag presence on growth in fast-growing fish generally take place soon after surgery (for Nile tilapia, Baras et al., 1999).

Following tagging, fish from each treatment were hosted in separate enclosures in an indoor recirculating water system, at 28°C under 12L:12D. Small (16 x 12.5 x 10 [h] cm, 2 L) suspended cages and medium size (40 x 40 x 19 [h] 30L) tanks were used for experiments with RFID-tags and PIT-tags, respectively. Fish were fed four times a day (08:30, 11:30, 14:30 and 17:30 h) except on days of tagging or measurement (2 meals at 14:30 and 17:30 h). Meal size was set at 3.25% body mass day<sup>-1</sup>, adjusted to the numbers of survivors and incremented every day to track fish growth, assuming a food conversion ratio of 1.00. Food composition (59% crude protein, 14 % lipids, 12 % ashes; Biomar, Brande, Denmark) and pellet diameter (< 0.5 mm) were satisfactory for the body size range under study. Excess food and dead fish were removed with a siphon every day. Fish growth was measured 3, 7 and 11 days after tagging using the same protocol as on the tagging day. The wound was also examined macroscopically for signs of infection or erythema, and degree of healing (open, visible, no longer conspicuous).

Batches of 10 individuals could be adequate for evaluating the effects of tagging on fish growth. By contrast, these low numbers, as well as the short duration of the study, did not suffice for providing accurate estimates of survival and tag retention rates. In order to bridge this gap, a second series of experiments (groups of over 30 fish, feeding in slight excess, 5 rearing weeks, weighing on tagging and final rearing day) was carried out with fish from a second progeny (Manzala population), but exclusively in the size categories that were recommended at the end of the growth study as the lower size limits for confidently tagging tilapia with small PIT-tags or RFID-tags.

## Calculations

In the tagging study, fish growth was expressed in terms of specific growth rate (SGR, % WM day<sup>-1</sup>), which was calculated as  $SGR = 100 (\ln[WM_2] - \ln[WM_1]) (t_2 - t_1)^{-1}$ , where WM is the fish body mass and t is the time (feeding days). Here, the actual individual SGR could be calculated for fish T, but not for others, which carried no tags. Henceforth, we calculated supposed individual SGR as follows. Within each group (C, P, S and T), the WM data on every particular day of measurement were sorted in ascending order, and it was assumed that each fish kept its size rank until the next measurement. Supposed individual SGRs were calculated on this assumption, which is conservative since it tends to minimise the actual between-individual variation of SGR, but it is the most likely assumption for very short periods of growth (3-4 days) in fish undergoing the very same treatment.

## Statistics

For the biometric study, phenotypic correlations between the measurements done on the digital photographs and the WM measured directly on the fish, were estimated (CORR procedure of the SAS software; Version 9.3, SAS Institute, Cary NC), and multiple-regression models were tested (REG procedure of the SAS software) to evaluate the relevance of the different morphometric variables to predict WM.

In the tagging study, the effect of surgery on fish survival was assessed with a stepwise multiple-regression analysis testing whether survival at D3, D7 and D11 was dependent on time elapsed since tagging, on fish size and on the degree of interference, which was coded as 1, 2, 3 and 4 for groups C, P, S and T, respectively. This indirect method was preferred to the use of contingency table analyses, which would have remained largely inconclusive because of low fish numbers per group, and were used exclusively for comparing survival between tag types for the same tag ratios. For each tag type, SGR values until D3, D7 and D11 were compared with two-way analyses of variance (2-way ANOVA), using size categories and treatments (C, P, S, T) as factors. A one-way ANOVA was used to test for discrepancies between the fish WM in treatments C, P, S and T at the start of each experiment. Pairwise differences between treatments were further tested with post-hoc Scheffe F-tests. Null hypotheses were rejected at  $P < 0.05$ .

## Results

### Biometric study

Phenotypic correlations between WM and morphometric measurements are shown in Table 1, together with elementary statistics. The fish used in this study averaged  $15.1 \pm 3.6$  mg and  $6.88 \pm 1.86$  mm in standard length. Body depth (BD) was not significantly correlated with WM, BS and BC but was significantly and negatively correlated ( $\rho = -0.859$ ) with SL. Body surface (BS) and contour (BC) were significantly and positively correlated ( $\rho = -0.835$ ), and both were strongly correlated with WM ( $\rho = -0.971$  and  $\rho = -0.752$ , respectively).

The correlations and the Akaike information criterion (AIC) estimated for multiple regression models enabled determining whether WM could be accurately estimated by a single or a combination of measured variables (Table 2). This analysis revealed that the model with the best AIC (-41.11) was the one using only BS and BC to estimate WM. The model using all SL and/or BD in addition to BS and BC showed slightly lower AIC values, but  $r^2$  values were most similar. Consequently, WM can be estimated from digital photographs as  $WM = -5.38 - 3.61 \times BC + 175.35 \times BS$ , with WM in mg, BC in mm and BS in  $mm^2$ .

### Fish tagging study

In the short-term (11-day) studies, the initial mean WM of fish in treatments C, P, S and T were almost identical (one-way ANOVA,  $P > 0.99$  in all cases; Table 3). Survival was low and varied significantly between tag types (contingency table analysis,  $P < 0.0001$ ; Table 1): 154 out of 240 fish (64 %) survived until D11 in the PIT-tag series *versus* only 93 fish (39 %) in the RFID-tag series. Stepwise multiple-regression analyses ( $df=71$ ) revealed that for both tag types survival declined significantly over time ( $P < 0.0001$ ), but also with increasing fish size ( $P = 0.0018$  for RFID-tags and  $P < 0.0001$  for PIT-tags), which is paradoxical, because tagging is generally more detrimental to small than to large fish. These analyses further revealed that the degree of interference ( $C < P < S < T$ ) had no significant effect on survival in the RFID-tag series ( $P = 0.1602$ ), whereas in the PIT-tag series, survival increased with increasing interference ( $P = 0.0419$ ). These results suggest that no step of the tagging procedure had a



significant negative impact on fish survival, except possibly for the smallest fish under study (200 and 300 mg for RFID-tags), for which dead individuals were observed less than 24 hours after tagging, whereas this did not happen in any other size category for any tag type. This higher sensitivity of very small fish to surgery is attested by their lower survival on D3 (80% for treatments P, S and T pooled) in comparison to larger fish with RFID-tags (95%), or to fish tagged with small PIT-tags for similar tags ratio (100% survival of 700 and 1000 mg fish) (chi-square with continuity correction,  $P$  of 0.0272 and 0.0008, respectively).

All survivors at D11 had retained their tags, and tags were systematically retrieved from the body cavity of fish dying in the meanwhile. As regards wound healing, all fish from the four largest size categories in treatments P, S and T had fully healed their wounds at D7, whereas in some individuals from the two smallest size categories for either tag type, wounds were still visible at D7, but no longer at D11.

As survival was low among the largest fish under study, fish from the four largest size categories were pooled into two new categories (400-500 and 600-700 mg for RFID-tags, and 1300-1700 and 2000-2500 mg for PIT-tags) to perform the analyses on fish growth. In both series of experiments, fish SGR decreased with increasing time in the rearing tanks, and on every day of measurement, it was significantly higher ( $P < 0.0001$ ) in small than in large fish (Figure 2). The effects of tag ratios, treatment and their interactions, were largely similar for the two types of tags. In both series, the SGR of the largest fish was not significantly affected by surgery or tag presence at any time (Figure 2). By contrast, fish SGR was significantly affected by surgery or tag presence for the two smallest size categories (200 and 300mg for RFID-tags, 700 and 1000 mg for PIT-tags) at D3. By D7, significant growth differences were restricted to the smallest fish only in each tagging series, and by D11 only to the 200 mg in the RFID tagging series.

Based on the results of the short-term studies, the highest tag ratio producing no significant effect on fish growth was about 2.5% for both tag types. Based on this information, two groups of fish were selected, with a WM of  $442 \pm 68$  mg (mean  $\pm$  S.D.) for RFID-tags and  $1.56 \pm 0.15$  g for small PIT-tags. No fish died during these experiments except for a couple of fish leaping out of the tanks and passing unnoticed until the final check. Five weeks after tagging, a single RFID-tagged fish (2.6%) had expelled its tag. A similar high tag retention rate (100%) was obtained for the PIT-tagged fish. In all fish retaining their tags, the tag was found free (i.e. not encapsulated) at different locations inside the body cavity and no damage to the viscera was observed.



## Discussion

### Biometric study

The present study provided further evidence that body length is not always a reliable predictor of fish body mass, as it was showed previously in Alaskan pollock and Alaskan salmon (Balaban et al., 2010a, 2010b), and especially in very small individuals. By contrast, the combined use of two other morphometric variables, body surface and body contour (excluding fins), produced quite accurate estimates of body mass ( $r^2=0.95$ ) in young Nile tilapia. The higher relevance of body surface and body contour in comparison to other, purely unidimensional morphometric variables such as body length is not surprising. Body surface is a bidimensional variable, and body contour, even though it is unidimensional, is influenced by both body depth and length. The two variables are not 100% redundant, as demonstrated by the AIC analysis, as their combination provides a better description of body shape (i.e. the very same surface area can apply to different body shapes).

Here, the relationships between body surface, body contour and body mass were best described by linear (simple or multiple) correlations (data not shown). This can be surprising at first sight, as relationships between uni- or bidimensional variables and volume (or mass) typically have a power (log-log) nature. This is probably because the size range under study here was particularly narrow, and linear relationships frequently apply in these circumstances. Hence, it is most probable that this linear model is not valid over a broader size range. Nevertheless, producing a model for a broader size range may not be indispensable, because larger fish are more tolerant to handling and measurement accuracy is proportionally better.

One major advantage of the method that was evaluated here lies in that the values of body surface and body contour can be obtained automatically from digital photographs while using Image J (as well as by several other software) once the fish body has been contoured. The contouring step can be achieved automatically as well, provided that photographs are brightly contrasted. The sole issue to a fully automatic measurement protocol refers to the idea that fins should not be included into body contour or surface, and this requires a fine adjustment of light and contrast. This can be complicated if fish of different sizes are examined, because fin transparency varies substantially with fish size. Likewise, if several fish are photographed at the same time to minimize working time and fish disturbance on the day of measurement,

it can be difficult obtaining truly homogeneous light conditions over the entire photograph, which could be improved using a light table allowing to enlighten the whole area in an homogeneous way.

### Tagging study

Fish survival during the tagging study was low, including among controls (Table 3). It cannot be ruled out that fish from this particular progeny were particularly sensitive to handling, but this is unlikely because mortality events did not take place soon after tagging, larger fish suffered higher mortality rates than others, and tagged fish paradoxically survived better than controls in most instances. Cousin et al. (2012) also found that zebrafish implanted with RFID-tags paradoxically exhibited higher survival rates than controls. This aberrant situation supposedly reflects the consequences of aggressive behaviours, which were frequently observed in the rearing tanks. Nile tilapia is a reputed aggressive fish, and aggressiveness is generally higher in recently domesticated populations than in others, as was precisely the case for the Hora strain of *O. niloticus cancellatus* under study here. It is possible that this behaviour was exacerbated by low fish numbers, as fish density has a well-known becalming effect in this species. This view is largely supported by the high survival rate during the 5-week experiment where tagged fish were reared in larger groups.

All in all, the present study indicates that tagging with RFID- or PIT-tags has no significant effect on fish survival, except for the smallest fish under study (200-300 mg for RFID-tags), as a few individuals died within hours following tagging, which suggests direct adverse effects from surgical tagging. Here, all fish originated from the very same progeny and the smallest fish were tagged first. It is frequent that surgeons' skills improve over time (Wagner and Cooke, 2005), so it cannot be excluded that higher survival could be obtained in such small fish with greater practice or if surgery had been performed by another operator.

Most tilapias healed their wounds within 7 days, which is more rapid than in most other studies on the insertion of electronic tags into the body cavity of fishes (47 days in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*; Prentice et al., 1990; 20 days in 2-8 g gilthead seabream *Sparus aurata*, Navarro et al., 2006; 18 days in 2-7 g Eurasian perch *Perca fluviatilis*, Baras et al., 2000). However, similar short healing times have been reported in fast-growing warm-water fishes (10 days in 2-15 g Nile tilapia; Baras et al., 1999; 7 days in age-0 juveniles of vundu catfish *Heterobranchus longifilis*; Baras and Westerloppe, 1999). The rate of healing is

proportional to the growth capacity of the fish (Lucas and Baras, 2000), which decreases as body size increases, so it is not surprising that healing was particularly fast in young Nile tilapia. Yet, wound healing took slightly longer in the smallest fish under study, in spite of their higher growth capacity (Figure 2). This is probably because the amount of damaged tissues was proportionally larger in small than in large fish, and this variable also affects healing time (Lucas and Baras, 2000; Jepsen et al., 2002).

No fish expelled its tag over 11 days during the growth study and a single tag loss took place during the 5-week experiment with RFID-tags. It is very rare that fish expel PIT-tags from their body cavities after the abdominal incision has healed completely (e.g. Ficke et al., 2012; for Nile tilapia, Baras et al., 1999). All cases of implant exit in the long term systematically involved tag encapsulation into fibrogranulation tissue (e.g. Gheorgiu et al., 2010), and no single trace of tag encapsulation was observed here.

As regards growth, similar effects were observed with RFID-tags and small PIT-tags for similar tag ratios, which supports the view that this variable is central to the determination of the minimal size for tagging fish. The similarity between the two tagging series also applied to puncture and sham tagging, probably because the two tags under study had similar shapes and required the infliction of wounds of proportionally similar sizes relative to the fish. Tagging with RFID-tags or small PIT-tags impacted significantly the growth of tilapia for tag ratios over 2.5-3.0% exclusively, similar to the results for standard PIT-tags in this species (Baras et al., 1999). However, these effects vanished rapidly as the fish grew beyond this seemingly critical ratio, and catch-up growth was observed, as in other species tagged with electronic tags (Atlantic salmon *Salmo salar*, Lacroix et al., 2004; zebrafish, Cousin et al., 2012). As indicated in the results, catch-up growth at D11 was not complete in the smallest RFID fish under study, thereby supporting the view that absolute body size also matters in addition to tag ratio. It should be reminded that during the present study fish were fed in excess and held in groups of fish of almost identical sizes that had undergone the very same degree of interference. More severe and probably longer growth penalties could be expected under restricted feeding or if tagged and untagged fish were reared communally.

The rationale for choosing the most adequate tag is intimately governed by fish size but also by the objectives and duration of the study. If it is indispensable that fish be tagged as young as possible, then RFID-tags should be preferred. However, if the study lasts for several months or requires that the fish attain a large size, then it is recommended that the fish be double-tagged later with standard PIT-tags, either in the abdominal cavity (fish  $\geq 4$ g) or in the epaxial muscles (fish  $\geq 30$  g): this is because the detection range of RFID-tags is low

(about 3 cm) and can compromise tag detection in larger fish. By contrast, if the study design can accommodate fish  $\geq 1$  g, then small PIT-tags are ideal, as their detection range (5-10 cm) can still be satisfactory for fish as large as 200-300 g, and also because their cost is much lower (about 2 euros *versus* 10 euros for RFID-tags). In many studies, the key variable is fish age, not size, and for instance, this is the case for sex determination studies in Nile tilapia (D'Cotta et al., 2001). To this respect, it should be reminded that Nile tilapia is a fast-growing species: for fish fed *ad libitum* with high energy formulated feed at 29°C, it takes about 12 days to pass from the start of exogenous feeding to 0.4 g (minimal size for RFID-tags), and another 7-10 days to attain 1.0-1.3 g (minimal size for small PIT-tags).

## Acknowledgements

Christian Ouedraogo benefited from a grant from the French Ministry of Foreign Affairs for his PhD research in France. Valuable advice on micro-tagging of very small fish was kindly provided by Marie-Laure Bégout (CREMA L'Houmeau) and Béatrice Chatain (Ifremer-UMR 110 Intrepid). The authors are grateful to Dominique Caseau-Baras Frédéric Clota, Hugues De Verdal, Cédric Genieys, Nina Meilisza and Clémence Ménard for punctual assistance during fish tagging and measurement. Etienne Baras is an honorary research associate of the Belgian National Foundation for Scientific Research.

**Table 1.** Description of fish under study (mean  $\pm$  standard deviation) and phenotypic correlations between the wet body mass (WM) of young Nile tilapia and morphological measurements (N=93,  $p$ -value<0.001; NS:  $p$ -value>0.05). BS: body surface; BC: body contour; SL: standard length and BD: body depth.

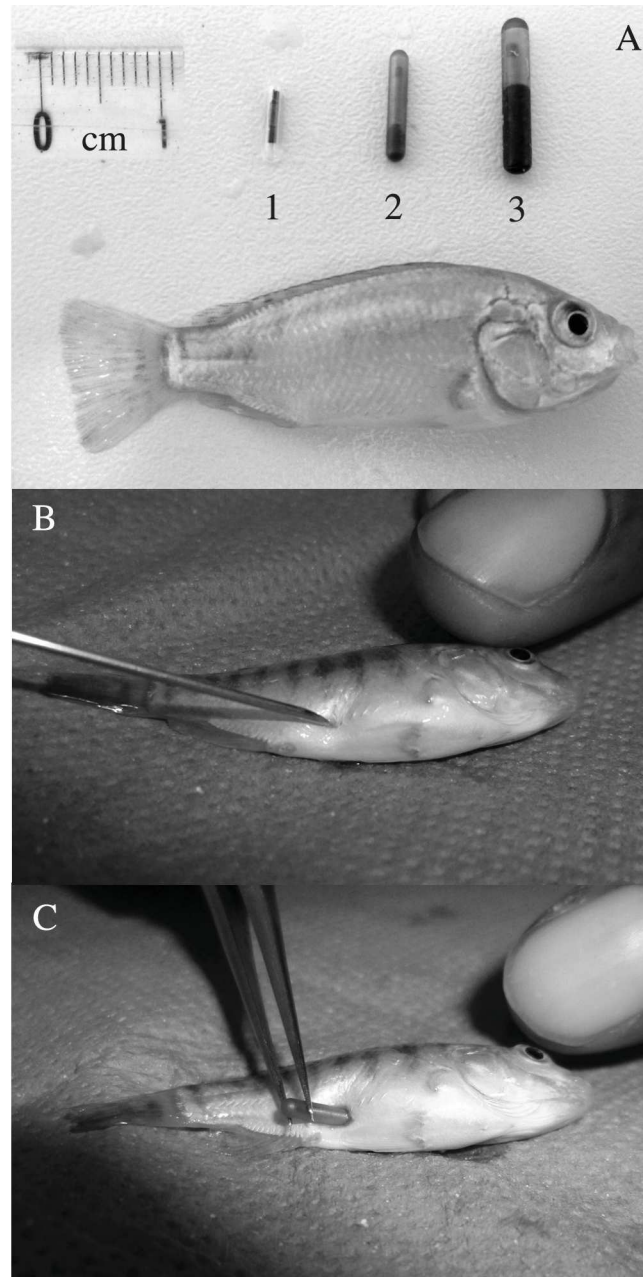
Variable	Mean $\pm$ Standard Deviation	Phenotypic correlations			
		BS	BC	SL	BD
WM (mg)	15.1 $\pm$ 3.61	0.971	0.752	0.363	0.039 <sup>NS</sup>
BS (mm <sup>2</sup> )	15.7 $\pm$ 2.30		0.835	0.391	0.019 <sup>NS</sup>
BC (mm)	2.08 $\pm$ 0.20			0.308	0.029 <sup>NS</sup>
SL (mm)	0.69 $\pm$ 0.19				-0.859
BD (mm)	0.49 $\pm$ 0.20				

**Table 2.** Correlations and AIC for different models of simple and multiple regression to estimate wet body mass (WM). BS: body surface; BC: body contour; SL: standard length and BD: body depth.

Traits in the model	Trait	$r^2$	AIC
1	BD	0.002	241.6
1	SL	0.132	228.6
2	BD + BC	0.566	166.2
1	BC	0.566	164.2
2	BC + SL	0.585	162.0
2	BD + SL	0.603	157.9
3	BC + SL + BD	0.709	131.1
3	BS + SL + BD	0.942	-19.68
2	BS + SL	0.942	-21.38
2	BS + BD	0.942	-21.60
1	BS	0.942	-22.90
4	BS + BC + SL + BD	0.954	-38.23
3	BS + BC + SL	0.954	-40.01
3	BS + BC + BD	0.954	-40.21
2	BS + BC	0.953	-41.11

**Table 3.** Size categories, initial wet body mass (WM) and coefficient of variation (CV WM) (mean  $\pm$  standard deviation among treatments), corresponding tag ratios and survival rates 3, 7 and 11 days after tagging in the two series of tagging experiments with RFID-tags and small PIT-tags. Treatments C, P, S and T refer to control, puncture, sham insertion and tagged fish, respectively.

RFID-tags				Survival (%) on			Small PIT-tags				Survival (%) on		
Size cat.	WM (mg) CVWM (%)	Load (%)	Treat.	D3	D7	D11	Size cat.	WM (mg) CVWM (%)	Load (%)	Treat	D3	D7	D11
200	222 $\pm$ 1 mg  6.8 $\pm$ 0.8 %	4.5	C	100	90	70	700	743 $\pm$ 2 mg  6.0 $\pm$ 0.9 %	4.3	C	100	100	70
			P	80	80	70				P	100	100	80
			S	100	80	50				S	100	100	80
			T	70	60	40				T	100	100	90
300	295 $\pm$ 1 mg  4.9 $\pm$ 0.6 %	3.4	C	80	70	50	1000	1014 $\pm$ 3 mg  5.2 $\pm$ 0.9 %	3.2	C	90	90	70
			P	100	70	40				P	100	100	90
			S	70	70	40				S	100	90	80
			T	60	50	40				T	100	100	90
400	392 $\pm$ 1 mg  4.1 $\pm$ 0.2 %	2.6	C	90	70	40	1300	1297 $\pm$ 2 mg  3.2 $\pm$ 1.0 %	2.5	C	100	70	70
			P	100	70	20				P	90	40	40
			S	80	60	40				S	100	80	70
			T	100	80	40				T	100	90	80
500	483 $\pm$ 1 mg  4.2 $\pm$ 0.6 %	2.1	C	90	80	40	1700	1686 $\pm$ 2 mg  3.3 $\pm$ 0.6 %	1.9	C	100	90	70
			P	90	90	50				P	90	70	60
			S	100	70	40				S	100	90	80
			T	100	90	60				T	90	90	70
600	595 $\pm$ 1 mg  4.5 $\pm$ 0.9	1.7	C	90	50	30	2000	1968 $\pm$ 2 mg  4.9 $\pm$ 0.4 %	1.6	C	80	60	40
			P	90	30	20				P	80	60	40
			S	90	40	10				S	90	70	50
			T	80	60	30				T	90	70	70
700	717 $\pm$ 3 mg  6.4 $\pm$ 1.1 %	1.4	C	60	10	10	2500	2529 $\pm$ 8 mg  4.0 $\pm$ 1.1 %	1.3	C	90	70	30
			P	100	70	60				P	90	60	40
			S	80	30	20				S	90	60	40
			T	90	50	30				T	80	50	40



**Fig. 1.** Tagging protocol. A. Nile tilapia (40 mm SL, 47 mm TL), together with a RFID-tag (6.0 x 1.0 mm ø; 1), a small PIT-tag (8.5 x 1.4 mm ø; 2) and a standard PIT-tag (12 x 2 mm ø; 3). B. Puncturing the fish abdominal body wall with a 21-gauge needle. C. Insertion of a small PIT-tag into the body cavity with fine dissection forceps.

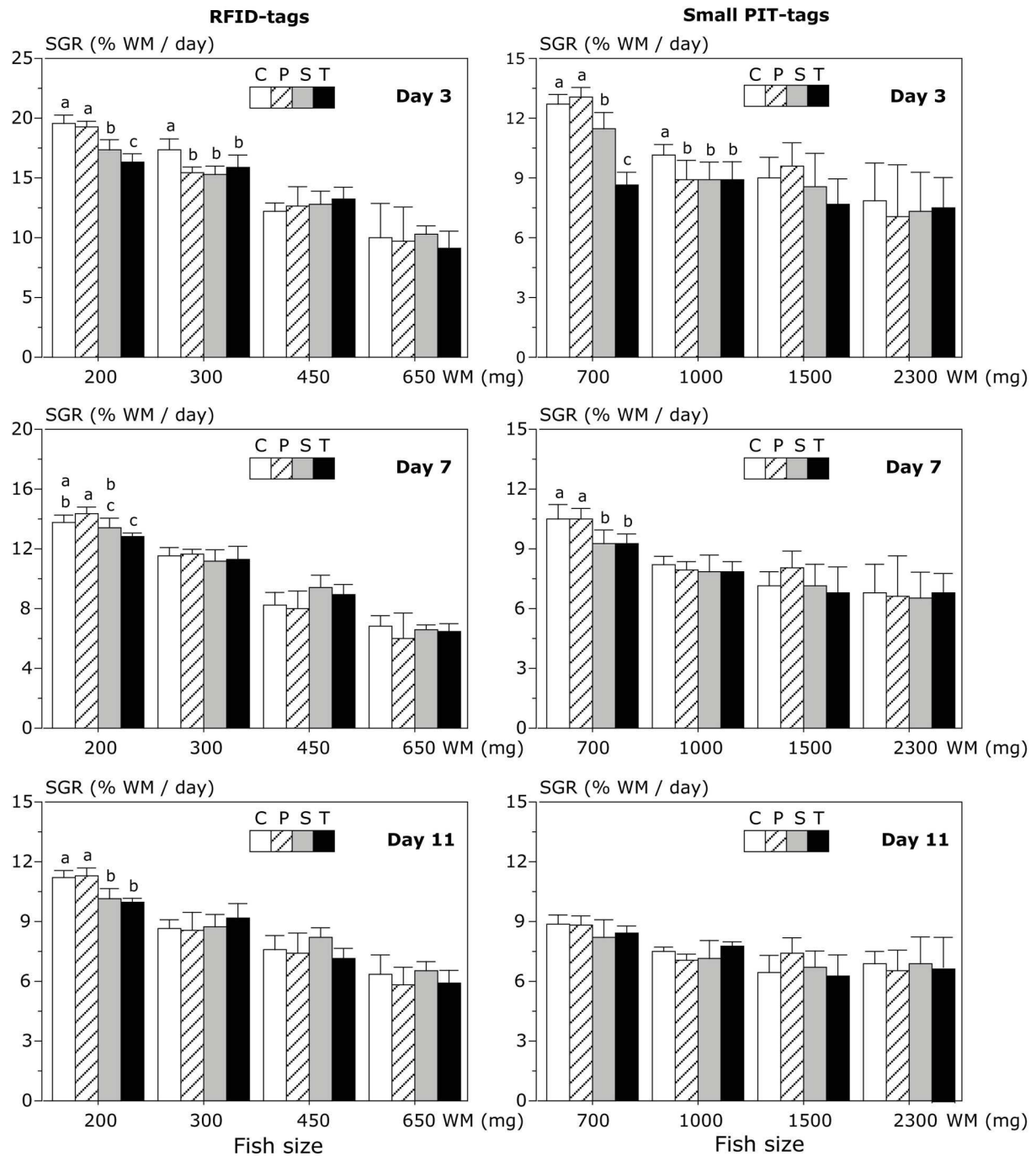


Fig. 2. Specific growth rates (SGR) of Nile tilapia of different sizes at different times after tagging, depending on tag type (RFID-tag *versus* small PIT-tag) and degree of interference; C = control (anaesthesia and measurement only), P = abdominal puncture; S = sham implantation; T = tag insertion. Bars and whiskers are means and standard deviations of individual SGR in survivors (see Table 3). The largest fish categories were clustered because of low survival. In each graph, for each size category, bars that share a superscript (a,b,c) in common do not differ at  $P < 0.05$  (Scheffe post hoc F-tests).

Statistics (2-way ANOVA for size, treatment and interaction): RFID-tags, D3 ( $df=206$ ):  $P$  of 0.0001, 0.0221 and 0.0007, respectively; D7 ( $df=150$ ):  $P$  of 0.0001, 0.5276 and 0.0001; D11 ( $df=92$ ):  $P$  of 0.0001, 0.0611 and 0.0001. Small PIT-tags, D3 ( $df=224$ ):  $P$  of 0.0001, 0.0001 and 0.0001; D7 ( $df=189$ ):  $P$  of 0.0001, 0.0089 and 0.0631; D11 ( $df=153$ ):  $P$  of 0.0001, 0.1253 and 0.0037.



2ème partie:  
Minimal body size for tagging fish with  
electronic microchips: study in the  
Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Chapitre  
2

Ouedraogo C.  
Canonne M.  
D'Cotta H.  
Baroiller J.F.  
Baras E.



## Abstract

The individual identification of fish is desirable from the smallest possible size, but it is crucial that tagging does not interfere with fish survival, physiology or behaviour. RFID-tags (10 mg) and PIT-tags (32 mg) were evaluated in fish of different sizes (200-500 mg and 640-1600 mg, wet mass, WM, respectively), producing four categories of tag load for each type of tag (5.0, 3.3, 2.5 and 2.0% WM; 30 fish per category and tag). Survival averaged 95.8 % for RFID-tags and 98.3% for small PIT-tags. Tag retention after 35 days was 99.1 and 96.6%, respectively. Tagged fish grew more slowly than controls. Growth penalty was proportional to tag load, but restricted to the first 4 days after tagging and compensated by catch-up growth, except in fish <300 mg, because of greater difficulties of handling and tagging. Small PIT-tags and RFID-tags can thus be used confidently in Nile tilapia of about 1.3 g and 0.4 g, respectively. If growth is not a premium, the corresponding minimal sizes are 1.0 and 0.3 g.

**Keywords:** tagging, fish, individual identification, PIT-tag, RFID-tag, growth

## Introduction

The individual identification of animals is now possible at any life stage or age when using genetic markers. Nevertheless, these techniques are not practical when a rapid identification is needed, the study design can be complicated, and operational costs can be excessive for repeated identifications, as typically happens during mark-recapture studies in the wild or growth experiments in controlled environments. Therefore, it is still necessary to mark or tag animals for many purposes (Gharrett and Seeb 1990; Nielsen, 1992; Lucas and Baras 2000; Skalski et al. 2009). Over the past three decades, passive integrated transponders (PIT-tags; Prentice et al. 1990) have become increasingly popular for a broad series of reasons: short tagging time, billions of available tag codes, rapid and univocal code reading, retention close to 100%, internal placement, which causes no postural disequilibrium or modification of the fish external aspect, and possibilities of automatic remote detection (e.g. Baras et al. 2000; Bolland et al. 2009; Ficke et al. 2012).

Standard PIT-tags are small (about 11 mm in length, 2 mm in diameter and 100 mg in mass), but nevertheless excessively large for tagging very small fish without impacting their physiology or behaviour. It is indeed recommended that the tag's weight does not exceed 2%

of the fish body mass and in any case 3%, otherwise their buoyancy is compromised (Alexander 1966; Winter 1983; Jepsen et al. 2002; Cooke et al. 2011). For standard PIT-tags, this gives a recommended fish mass of about 5 g and a minimal fish mass of about 3-4 g.

Recently, manufacturers have produced PIT-tags with smaller dimensions (about 30 mg), and more recently a new generation of small (about 10 mg) internal biocompatible electronic tags (radio-frequency identification – RFID – tags), has been developed and applied to very small animals like ants (Moreau et al. 2011), bees (Decourtye et al. 2011) and zebrafish *Danio rerio* (Cousin et al. 2012). Can the size limit for implanting confidently these tags in small fish be transposed from the constraints upon added load that were documented for larger tags, or is their limit further dependent on other aspects inherent to the difficulty of handling and tagging very small organisms?

The present study aimed to evaluate these two types of tags in fish of different sizes, with the objective of determining the critical size beyond which tagging or tag presence has no significant impact on fish survival, tag retention and growth. The species under study was the Nile tilapia, a fast growing tropical freshwater teleost for which individual identification at a small size or young age is essential, notably to understand the process of sex differentiation/determination (D'Cotta et al. 2001; Baroiller et al. 2009) and emergence of between-sex growth dimorphism (Baras and Mélard 1997; Toguyéni et al. 2009). No comparison with standard (100 mg) PIT-tags was done here, as information for this tag type is already available for Nile tilapia (Baras et al. 1999).

## Methods

The fish used in this study originated from two progenies (one for each type of tag), both obtained from the spontaneous reproduction of captive broodfish of the Manzala strain (Lake Manzala, Egypt) in the experimental infrastructures of GAMET (Groupe d'Aquaculture continentale Méditerranéenne et Tropicale, Montpellier France). Prior to tagging the fish were reared communally in a (45 x 35 x 32 [h] cm) 50-L tank in the same recirculating water system and fed the same food as during the growth experiments. One progeny was used for tagging with RFID-tags (6 mm x 1 mm Ø, 10mg, 13.56 MHz, Nanotec RFID, Lutronic International, Rodange, Luxembourg, [www.nanotec.net](http://www.nanotec.net)) and the other progeny for small FDX (full duplex) PIT-tags (8.5 x 1.4 mm Ø, 32 mg, 134.2 kHz, RealTrace, Villebon-sur-Yvette, France, [www.realtrace.com](http://www.realtrace.com)).

## Tagging protocol

Fish were anaesthetised (eugenol,  $0.05 \text{ mL.L}^{-1}$ ), weighed (nearest 0.1mg), then placed in lateral recumbence onto soaked paper for surgery. Thereafter, the flank of the fish was punctured with a sterile syringe needle (23 gauge for RFID-tags and 21 gauge for PIT-tags) about 2-3 mm cranial to the anus and 2-3 mm off the mid-ventral line. The tag was sterilised with 95% ethanol and rinsed with physiological saline. Its anterior part was inserted into the body cavity with fine dissection forceps then the tag was gently pushed entirely inside with the fingertip. The entire protocol (including anaesthesia) always required less than 3 minutes per fish, of which no more than 15 seconds for tagging. The fish was then returned to anaesthetic-free water at room temperature ( $26\text{-}28^{\circ}\text{C}$ ) until full recovery of balance and spontaneous swimming (always less than 2 minutes). Surgery success can be strongly dependent on the surgeon's experience or skill (Jepsen et al. 2002; Wagner and Cooke 2005; Skalski et al. 2009), so tagging was performed by the same surgeon throughout the present study.

## Experimental design

For each type of tag, fish belonging to four different size categories were considered. The smallest size category was defined after characterization of the relationship between the fish wet body mass (WM) and the length of the body cavity in Nile tilapia, in order to determine the physical limit for the insertion of RFID-tags. This limit was found to be about 150 mg, so it was decided to evaluate size categories of 200, 300, 400, and 500 mg for this type of tag (corresponding tag ratios in air of 5.0, 3.33, 2.5 and 2.0 %, respectively). The very same tag ratios were used for small PIT-tags, thereby resulting in the selection of size categories of 640, 960, 1280 and 1600 mg (Table 1).

In each size category, 30 fish were assigned as treatments (T, tagged fish, as above) and 30 other fish as controls (C, anaesthetised, handled and weighed only). The WM of every individual fish remained within 10% of the target WM. Fish assignment was random, yet it was ensured that no deformed fish was selected and that the average WM of C and T fish were as similar as possible (Table 1).

For every size categories, the comparison between C and T extended over no more than 10 days, because young, fast-growing fish can heal their wounds rapidly (Jepsen et al. 2002; Cooke et al. 2011), and most adverse effects of surgical tagging or tag presence on growth generally take place within the first days following surgery in fast-growing fish (for Nile tilapia, Baras et al. 1999). In order to test for tag retention, all tagged fish were reared for another 25 days (thus until 5 weeks after tagging). No longer term was evaluated here, because the detection range of RFID-tags is about 3 cm, thereby making their detection difficult in fish > 10 g.

### Rearing and measurement

Following measurement or tagging, fish were hosted in 16 separate tanks (45 x 35 x 32 [h] cm, 50 L) in an indoor recirculating water system, at 29°C under 12L:12D. Fish were fed formulated feed (59% crude protein, 14 % lipids, 12 % ash; pellet diameter < 0.5 mm; Biomar, Brande, Denmark). Food was distributed with automatic feeders (EHEIM GmbH & Co. KG, Germany) four times a day during daylight hours (09:00, 11:30, 14:00 and 17:30 h), except on days of tagging or measurement (2 meals at 14:00 and 16:30 h). In all instances, meal size was set at 2.5% WM day<sup>-1</sup> until 10 days after tagging. Thereafter, the daily food ration was restricted to about 5% WM day<sup>-1</sup> until 35 days after tagging. The amount of food was systematically adjusted to the numbers of survivors (daily search for dead fish), which was important for comparisons of growth rates, as food was not distributed in excess.

Fish growth was measured 4, 10 and 35 days after tagging, using the same protocol as on the tagging day. The wound was also examined macroscopically for signs of infection or erythema, and degree of healing (open, visible, no longer conspicuous). On D35, fish were anaesthetised, killed with an excess dose of anaesthetics (0.3 mL eugenol L<sup>-1</sup>) and autopsied to search for possible damage inflicted by surgery or tag presence to the viscera, and to examine whether tags were encapsulated or free inside the body cavity.

## Calculations

Fish growth was expressed in terms of specific growth rate (SGR, % WM day<sup>-1</sup>), which was calculated as  $SGR = 100 (\ln[WM_2] - \ln[WM_1]) (t_2 - t_1)^{-1}$ , where WM is the fish body mass and *t* is the time. Here, time was expressed in terms of feeding days rather than rearing days, because no food was offered during the morning following tagging or measurement (thus 3.5 and 5.5 feeding days for growth periods D0-D4 and D4-D10, respectively). The actual SGR of individual fish could be calculated for fish T, but not for fish C, which carried no tags. Henceforth, we calculated supposed individual SGR as follows. Within each treatment (C and T), the WM data on every particular day of measurement were sorted in ascending order, and it was assumed that each fish kept its size rank until the next measurement. Supposed individual SGR values were calculated on this assumption, which is conservative since it tends to minimise the actual between-individual variation of SGR, but it is the most likely assumption for short periods of growth (about 5 days). Nevertheless, data on the actual SGR of tagged fish were used to test whether the growth of tagged fish varied with body size within a particular size category.

## Statistics

Contingency table analyses were used to compare survival rates and proportions of tag retention and encapsulation among size categories and treatments (C vs. T). For each type of tags, supposed individual SGR values until D4 and D10 were compared with two-way analyses of variance (2-way ANOVA), using size categories (four modalities) and treatments (two modalities) as factors. Pairwise differences between treatments were tested with post hoc Scheffe F-tests. Simple regression analyses were used to test whether the actual individual SGR of tagged fish was correlated with WM at tagging within each size category. Null hypotheses were rejected at  $P < 0.05$ .



## Results

The actual body sizes of fish at the time of tagging were very close to the target values (Table 1). For both types of tags and all size categories, the mean WM of fish in treatments C and T were almost identical (one-way ANOVA,  $P>0.99$  in all cases).

**Table 1.** Size categories, initial wet body mass (WM), corresponding tag load and survival 4, 10 and 35 days after tagging in the two series of tagging experiments with RFID-tags and small PIT-tags.

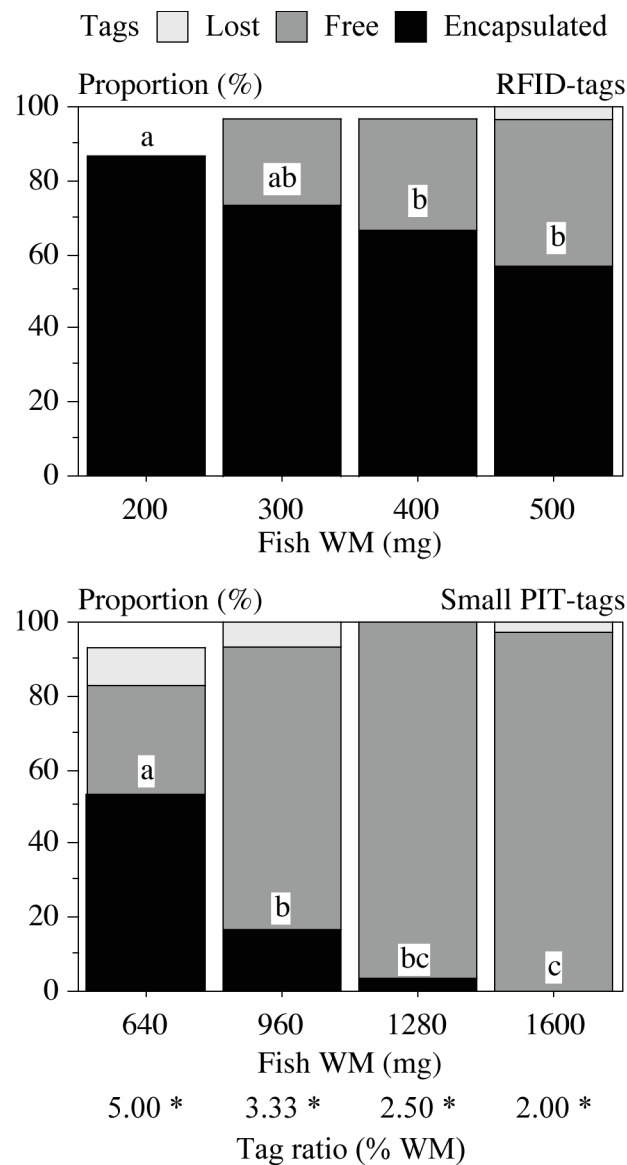
RFID-tags (10 mg)				Survival (%) on			Small PIT-tags (32 mg)			Survival (%) on		
Load (%)	Size cat.	Mean WM $\pm$ S.D. (mg)	C/T	D <sub>4</sub>	D <sub>10</sub>	D <sub>35</sub>	Size cat.	Mean WM $\pm$ S.D. (mg)	C/T	D <sub>4</sub>	D <sub>10</sub>	D <sub>35</sub>
5.00	200	200.6 $\pm$ 10.2	T	90.0	86.7	83.3	640	647.7 $\pm$ 35.1	T	93.3	93.3	93.3
		200.2 $\pm$ 10.7	C	100	100	-		646.7 $\pm$ 28.8	C	100	100	-
3.33	300	299.6 $\pm$ 19.0	T	100	100	96.7	960	960.6 $\pm$ 52.7	T	100	100	100
		300.5 $\pm$ 16.5	C	100	100	-		960.6 $\pm$ 41.0	C	100	100	-
2.50	400	400.1 $\pm$ 22.9	T	96.7	96.7	96.7	1280	1298.0 $\pm$ 63.0	T	100	100	100
		400.4 $\pm$ 20.1	C	100	100	-		1298.6 $\pm$ 54.0	C	100	100	-
2.00	500	499.5 $\pm$ 21.0	T	100	100	100	1600	1629.2 $\pm$ 88.5	T	100	100	100
		498.0 $\pm$ 26.2	C	100	100	-		1632.8 $\pm$ 73.2	C	100	100	-

Load: tag mass: fish mass ratio (%). C: control fish (weighed only); T: tagged fish; 30 siblings per situation for each size category.

### Survival

In both rearing trials, survival in control groups was 100% (Table 1). Survival of tagged fish was also very high (on average 95.8 % for RFID-tags and 98.3% for small PIT-tags), except in the smallest size categories (26 out of 30 fish at 200 mg WM for RFID-tags, and 28 out of 30 fish at 640 mg WM for small PIT-tags), thereby indicating that very high tag ratios (5%)

were detrimental to fish survival (contingency table analysis,  $P=0.0120$ ; Table 1). Every fish death took place during the first three days after surgery, with one exception (RFID-tag, 200 mg WM, 6 days after tagging). From D10 to D35, only two RFID-tagged (and no PIT-tagged) fish died.



**Fig. 1.** Survival, tag retention and encapsulation in young Nile tilapia 35 days after tagging with RFID-tags or small PIT-tags, as a function of tag ratio (tag mass: fish wet body mass WM). In each graph, bars that share a superscript in common do not differ at  $P<0.05$ . An asterisk next to the tag ratio indicates a difference at  $P<0.05$  between the two types of tags.

Statistics (contingency table analyses): RFID-tags ( $df=6$ ),  $P$  of 0.0024; small PIT-tags ( $df=6$ ),  $P<0.0001$ ; comparisons between tag types for identical tag ratios ( $df=2$ ):  $P$  of 0.0007 for tag ratio 5% and  $P<0.0001$  for other tag ratios.



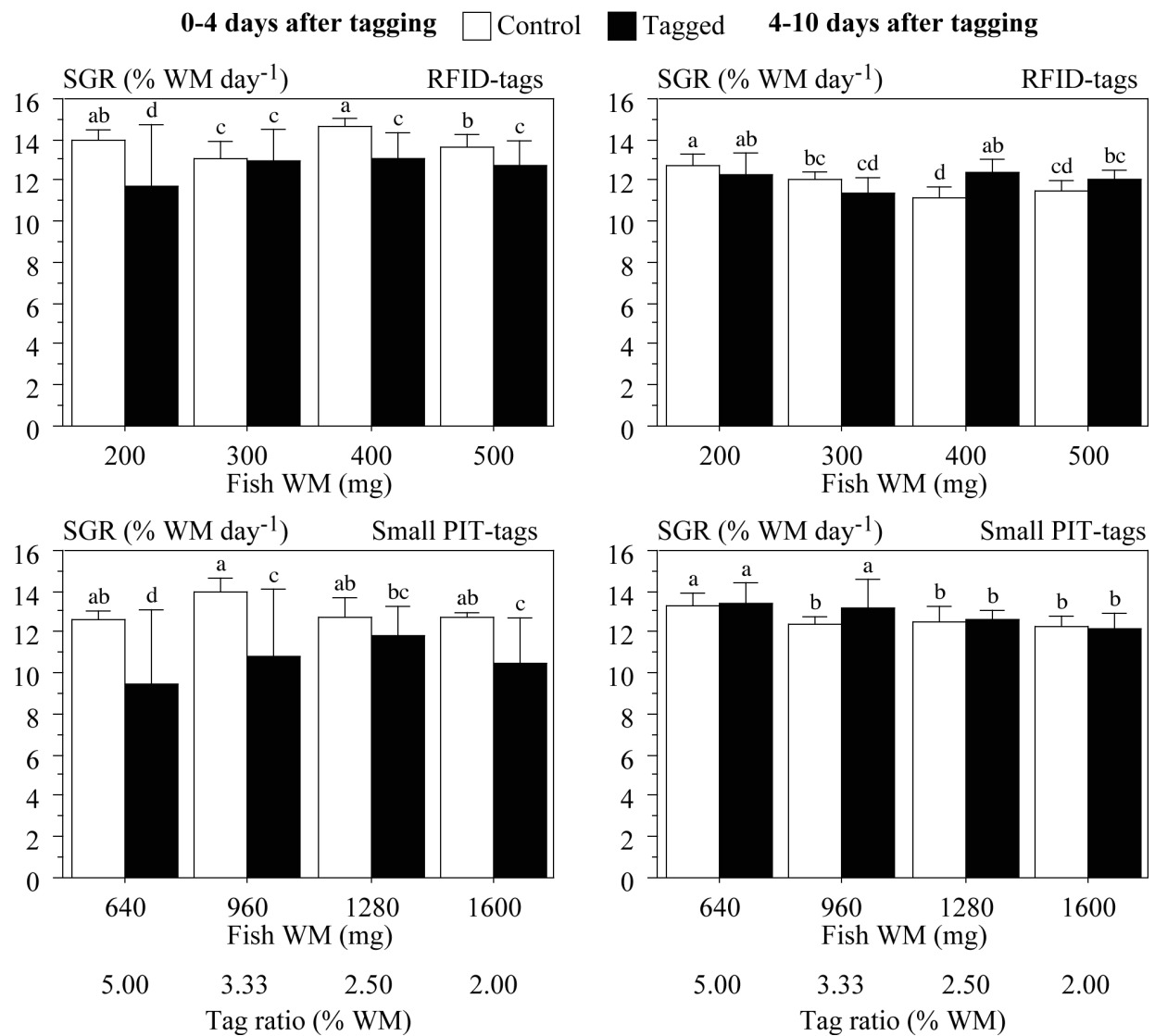
## Wound healing, tag retention and encapsulation

By D10 traces of surgery were no longer conspicuous to the observer's naked eye in any tagged fish. By D4, wounds were still visible, but fish with a low tag ratio had healed their wounds at a proportionally faster rate than others, both in the RFID-tag and PIT-tag series. By D35, tag retention among survivors was high (99.1 and 96.6%, in the RFID-tag and PIT-tag series, respectively; Fig. 1). Every tag expulsion event took place before D4.

On D35, fish were at least 13 times as large as on the tagging day. Autopsies revealed contrasting situations as regards tag position (cranial or caudal inside the body cavity), orientation (ranging from horizontal to almost vertical) or encapsulation. The two former variables did not vary between size categories, whereas the proportion of encapsulated tags decreased significantly ( $P<0.05$ ) with decreasing tag ratios (Fig. 1). Proportionally, RFID-tags were encapsulated more frequently ( $P<0.05$ ) than PIT-tags.

## Fish growth

Effects on growth were largely similar in the two tagging series. In both series, controls exhibited very good food conversion ratios (0.66-0.67) and grew rapidly (WM on D10 >3 times as large as on D0), with limited size dispersal and little differences between size categories (Fig. 2). Until D4 tagged fish grew at a slower rate than controls. Differences between C and T fish were highest for the highest tag ratios (200 mg and 640 mg fish for RFID-and small PIT-tags, respectively; Fig. 2) and decreased with decreasing tag ratios. From D4 to D10, tagged fish exhibited growth rates that were similar to or slightly higher than those of control fish, thereby compensating for the weight loss incurred during the first days after surgery. Nevertheless, a careful examination of the data revealed that no such compensation occurred for the two smallest size categories in the RFID-tag series, in contrast to the situation in the small PIT-tag series. Analyses of the actual individual SGR of tagged fish within each size category revealed no significant correlation between SGR and WM at the time of tagging, thereby indicating that the aforementioned effects were homogeneous within each size category.



**Fig. 2.** Specific growth rates (SGR) of Nile tilapia of different wet body masses (WM) tagged with RFID or small PIT-tags at 4 days and 10 days after tagging. Bars and whiskers are means and standard deviations of individual SGR in survivors (see Table 1). In each graph, bars that share a superscript in common do not differ at  $P < 0.05$  (Scheffe post hoc F-tests).

Statistics (2-Way ANOVA for tag ratio, treatment and interaction): RFID-tags, D4 ( $df=227$ ):  $P$  of 0.0004,  $<0.0001$  and 0.0003, respectively; D10 ( $df=226$ ):  $P < 0.0001$ , 0.0510 and  $<0.0001$ . Small PIT-tags, D4 ( $df=230$ ):  $P$  of 0.0010,  $<0.0001$  and 0.0042; D10 ( $df=230$ ):  $P < 0.0001$ , 0.0128 and 0.0122.

## Discussion

The present study indicated that tagging Nile tilapia with RFID-tags or small PIT-tags had no significant effect on survival and tag retention, except for tag ratios  $\geq 5\%$ . Every tag loss in the present study took place before the abdominal incision was fully healed, less than 10 days after tagging. This is a rapid healing rate in comparison to most other studies on the insertion of small tags into the body cavity of fish (about 30 days in parrs of the Atlantic salmon *Salmo salar*, Roussel et al. 2000; 20 days in 2-8 g gilthead seabream *Sparus aurata*, Navarro et al. 2006; 18 days in 2-7 g Eurasian perch *Perca fluviatilis*, Baras et al. 2000). However, similar short healing times have been reported in fast-growing warm-water fishes (10 days in 2-15 g Nile tilapia; Baras et al. 1999; 7 days in 5-g juveniles of vundu catfish *Heterobranchius longifilis*; Baras and Westerloppe 1999), and it is well known that the healing rate of fishes is proportional to their growth potential and to water temperature (Lucas and Baras 2000; Jepsen et al. 2002; Cooke et al. 2011).

Upon autopsy on D35, no damage to the viscera was observed. Tags were either found free in the body cavity or encapsulated by host tissues. It is generally assumed that encapsulation is species specific (Jepsen et al. 2002) as well as a matter of tag coating (Marty and Summerfelt 1986; Helm and Tyus 1992). Here, evidence is provided that tag encapsulation can be proportional to the added load (Fig. 1). This is probably because larger tags cause a higher gravity pressure and subsequent damage upon tissues, and also because the wound is proportionally more severe in small than in large fish, resulting in more bleeding and clotting. Both factors contribute to the proliferation of fibrogranulation tissue and tag encapsulation (Jepsen et al. 2002). Encapsulation is a prerequisite to the expulsion of surgical implants in fish (Marty and Summerfelt 1986; Baras and Westerloppe 1999; Gheorgiu et al. 2010), but no synonymous either (Thoreau and Baras 1997; Jepsen et al. 2002). Here, tag expulsion in the long term is unlikely, because fish grew rapidly their abdominal body wall became thicker, and the relative gravity pressure by the tag decreased progressively.

Here, every tag was detected rapidly upon every manual inspection, at least for small PIT-tags, whereas the detection of RFID-tags proved difficult in several instances, because of their shorter reading distance. This limitation was no major obstacle here, as tags were detected manually and all fish had been tagged. By contrast, this could be an issue for mark-recapture studies in the wild and for automatic tag reading, because tag orientation was highly variable in respect to the fish sagittal axis, whereas this factor governs the reading distance (e.g. Baras et al. 2000).

As regards fish growth, the present study provided evidence that similar effects were observed with RFID-tags and small PIT-tags for similar tag ratios, which supports the view that the added load variable is central to the determination of the minimal body size for fish tagging (Winter 1983; Jepsen et al. 2002; Cooke et al. 2011). Tagging and tag presence impacted tilapia growth significantly for tag ratios over 2.5-3.3%, and effects vanished rapidly as the fish grew bigger (Fig. 2). The highest tag ratio for tagging Nile tilapia with standard PIT-tags without impacting their growth significantly was similar (Baras et al. 1999). This is in good agreement with the general recommendations on acceptable tag ratios for fish tagging (Winter 1983). Furthermore, most fish in the present study exhibited some compensatory growth following the initial period of depressed growth, as also observed in other species tagged with electronic tags (Atlantic salmon, Lacroix et al. 2004; zebrafish, Cousin et al. 2012). However, it is worth noting that the smallest fish under study here (200 and 300 mg WM, RFID-tag) did not exhibit any compensatory growth until D10, in contrast to their counterparts (same tag ratios) in the PIT-tag series (640 and 960 mg WM). This difference presumably reflects the difficulty of handling and tagging very small fish.

It should be further reminded that during the present study fish were housed in separate groups, in which all individuals of almost identical sizes had undergone the very same degree of interference. More severe and probably longer growth penalties could be expected if tagged and untagged fish were reared altogether, especially under submaximal feeding.

When taking into account the effects on growth and survival, small PIT-tags and RFID-tags can be used confidently in Nile tilapia about 1.3 g and 0.4 g, respectively. If growth is not a premium, the corresponding minimal sizes are 1.0 and 0.3 g, respectively. These recommendations largely meet those of Cousin et al. (2012) for RFID-tagging in zebrafish, but they cannot be extended to all fish species, because of variable sensitivity to handling and dimensions of body cavity (e.g. the body cavities of many catfishes, flatfishes or cottid fishes are about twice as short as in tilapias).

The rationale for choosing the most adequate type of tag is governed by fish size, but also by the context of the study. If fish must be tagged as young or small as possible, then RFID-tags should be preferred. However, the detection range of RFID-tags (about 3 cm) can become limiting in fish > 10g. If the study is continued until fish attain a large size, then it is recommended to double-tag them later with standard PIT-tags. This is feasible in experimental environments, but not in the wild because of partial recapture. If the study design can accommodate fish of about 1 g, then small PIT-tags are ideal, because their

detection range (5-10 cm) can still be satisfactory for fish of 200-300 g, and their cost is much lower (about 2 vs. 5 € for RFID-tags).

## **Acknowledgements**

Christian Ouedraogo benefited from a grant from the French Ministry of Foreign Affairs for his PhD research in France. Valuable advice on micro-tagging of very small fish was kindly provided by Marie-Laure Bégout (CREMA L'Houmeau) and Béatrice Chatain (Ifremer-UMR 110 Intrepid). Etienne Baras is an honorary research associate of the Belgian National Foundation for Scientific Research.

# Growth and survival of XX Nile tilapia masculinised with elevated temperature, 17 $\alpha$ -methyltestosterone and fadrozole in comparison to XX females and XY males

Chapitre

3

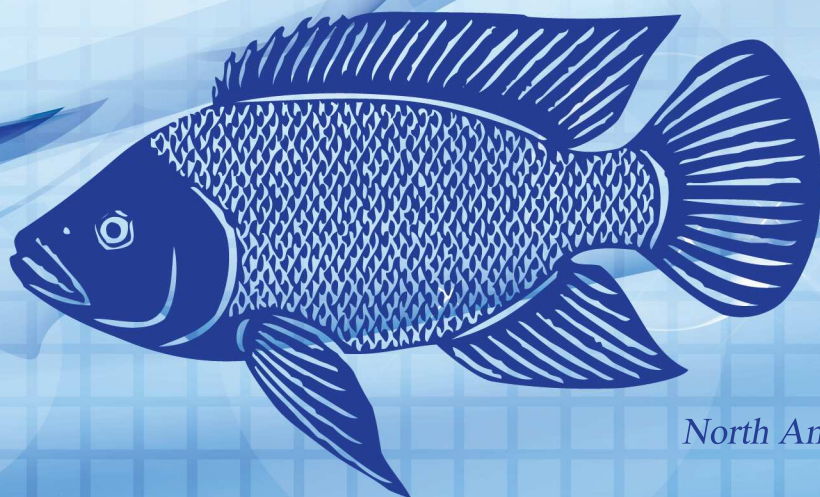
Ouedraogo C.

Canonne M.

D'Cotta H.

Baras E.

Baroiller J.F.



*North American Journal of Aquaculture, soumis*



## Abstract

Monosex male rearing is desirable in Nile tilapia for taking advantage of between-sex growth dimorphism and restricting uncontrolled breeding. Alternatives to exogenous steroids for masculinising progenies have been explored, notably elevated temperatures and non-steroidal inhibitors of aromatase, such as fadrozole. However, there has been no comparison of the effects of these methods on the growth and survival of fish from the same batch in the same rearing environment, to avoid family and environmental effects. Here, fish were produced from an egg batch from three XX females fertilized by sperm pools of three XX males or three YY males. The all-XX batch was subdivided into four groups, three of which were masculinised from 10 to 40 days after fertilization (dpf) using elevated temperature (37°C), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (60 mg kg<sup>-1</sup> feed) or fadrozole (500 mg kg<sup>-1</sup> feed). Remaining XX and XY fish served as female and male controls, respectively. From 51 to 186 dpf, following size sorting, fish (6.5 $\pm$ 0.5g) were reared communally. Survival at 40 dpf was 99-100% except at 37°C (54%,  $P<0.05$ ). During the period of communal rearing survival averaged 91% and did not differ between treatments. At 40 dpf, fish masculinised with chemicals were larger ( $P<0.05$ ) than those reared at 37°C and than XY and XX controls. From 51 to 186 dpf, growth did not differ between XY males and XX masculinised fish, except during the first rearing weeks, when fish formerly raised at 37°C grew more slowly than others. This comparison indicates that elevated temperature can be a valuable, residue-free alternative to chemicals for masculinising Nile tilapia, though to the expense of slightly slower initial growth and lower survival. These issues could be alleviated by the selection of strains adapted to high temperatures or producing all-male progenies at lower temperatures.

**Keywords:** Nile tilapia, aquaculture, masculinisation, growth, survival

## Introduction

Tilapias, and in particular the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, are amongst the most important species for fish culture, especially in tropical regions (FAO 2010). Since the last four decades there has been an increasing trend towards monosex male rearing of Nile tilapia to take advantage of the between-sex growth dimorphism (Baroiller and D'Cotta 2001; Beardmore et al. 2001) and to limit the risk of uncontrolled breeding of this species that can cause crowding and dwarfism (Baroiller et al. 2009). Since the first trials relying on manual sexing and hybridization between species with different sex determination mechanisms

(Pruginin et al. 1975), several methods have been developed to produce monosex male progenies (reviews in Baroiller et al. 2009; Beardmore et al. 2001; Devlin and Nagahama 2002).

The dietary administration of male steroidal hormones that act directly on gonad differentiation during the early life stages has been used for decades (Mair et al. 1987; Shelton et al. 1978) and is still the major masculinising procedure used in tilapia farming nowadays. However, it raises issues concerning the environment, fish farmers and consumers health. More recently, alternatives to androgens have been evaluated, in particular non-steroidal aromatase inhibitors such as fadrozole (Afonso et al. 2001; Guiguen et al. 2010; Kwon et al. 2000). Sexually reversed broodfish have also been used to produce all-male progenies (YY males, Baroiller and Jalabert 1989; Scott et al. 1989), but their production is long and tedious, and broodstock management can be complicated, especially in small farms. More importantly, the crossing of YY males with XX females does not systematically sire a 100% all-male population, and in some cases the proportion of unexpected females can be over 35% (Baroiller and D'Cotta 2001). Furthermore, YY males are reputedly more aggressive than XY males (Jordaan 2004) and this can result in a lower reproduction frequency and production of offsprings (Baroiller et al. 1996; Mair et al. 1997; Ovidio et al. 2002). It has also been demonstrated that temperatures above 32°C can override the effect of sex chromosomes in Nile tilapia and produce high-percentage or all-male progenies when fry are exposed at such high temperatures for at least 10 days starting at 10 days post-fertilization (Baroiller et al. 1996 2009; Ospina-Alvarez and Piferrer 2008). This thermosensitivity causing masculinisation is hereditary and additive with a contribution of both parents (Baroiller and D'Cotta 2001; Wessels and Hörtsgen-Schwark 2007), and not all individuals are equally sensitive (Baroiller et al. 1996, 2009). This treatment can be associated in some cases with lower survival and slower growth, at least during the weeks of exposure to warm temperatures (Abucay et al. 1999; Baras et al. 2001). Nevertheless, it is a promising masculinising procedure for tilapia farming, especially if there is some selection of thermosensitive broodstocks to increase the proportion of male offspring (Baroiller et al. 2009; Tessema et al. 2006; Wessels and Hörtsgen-Schwark 2007).

A central concern to the selection of an adequate technology for producing all-male progenies of Nile tilapia refers to the survival and growth rates of the sex-reversed fish during and after the end of the masculinising treatment. This issue has been tackled on several occasions, but almost systematically for a single masculinising technology that was compared to all-male XY or mixed-sex progenies (Chakraborty et al. 2011; El-Greisy and El-Gamal 2012; Little et al. 2003; Mair et al. 1995; Mruck et al. 2013; Toguyéni et al. 2002). The comparison of



growth performances across these studies has a limited scope, because of strong family and environment effects on the growth of Nile tilapia.

The present study aimed to address this question by comparing the survival and growth rates of XX Nile tilapia masculinised with  $17\alpha$ -methyltestosterone, fadrozole and high water temperature (37°C) to those of genetic females (XX) and genetic males (XY). Here, fish from all groups originated from the same batch of eggs and were raised communally.

## **Methods**

### Biological material and experimental design

All fish originated from the same batch of eggs obtained from three XX females of Nile tilapia collected by hand stripping following the synchronization of female broodstock by changes in fish density, light cycle, water temperature and addition of urine from male tilapia (Biswas et al. 2005; Dulka et al. 1987; Huertas et al. 2014; Kime and Hyder 1983;). About 20% of the eggs were fertilized artificially with a pool of sperm obtained from three YY males (Baroiller and Jalabert 1989; Scott et al. 1989) to produce an all-male XY progeny. The remaining 80% of the eggs were fertilized with a pool of sperm from three XX males (Baroiller et al. 1995a) to produce a large all-female XX batch. Broodstock originated from the Manzala strain reared at the University of Liège (Belgium). The XX and YY male broodfish have been produced by hormonal sex reversal and their genotype (XX or YY) was confirmed by progeny testing (C. Mélard, University of Liège, personal communication), as already described by Baroiller et al. (1989) and Scott et al. (1989). At the age of 10 days after fertilization (dpf), the batch sired by XX males was subdivided randomly into four groups, three of which were subjected to masculinisation treatments (see below) that were applied from 10 to 40 dpf. The remaining group was the “female control” group, as it was assumed to comprise all-female individuals. Likewise, the fish sired by YY males constituted the “male control” group, which was assumed to comprise all-male individuals. Each of the five groups comprised 85 individuals.

It was anticipated that at the end of the treatment period (40 dpf), the wet body mass WM of fish would differ between treatments, because between-sex growth dimorphism can take place at a young age and small size in Nile tilapia (Baras and Mélard 1997). Likewise, the

water temperatures that are accompanied with high masculinising efficiencies in Nile tilapia are well above the thermal optimal for growth of this species (Azaza et al. 2008), so slower growth was also anticipated in fish masculinised at high temperature (XX 37°C). On the other hand, it mattered that when fish originating from the different treatments were pooled for the communal rearing trial, their sizes were as similar as possible. Indeed, dominance hierarchies are frequent in Nile tilapia, and strongly size-dependent, generally to the detriment of the smallest individuals. Henceforth, it was decided to use a “buffer period” between the treatment period and the common garden period, in order to compensate, through an adjustment of the food ration, for the size differences at the end of the treatment period. In view of the extent of the differences observed here (see results), the duration of this buffer period was set at 11 days. The common garden trial thus started at 51 dpf and extended until 186 dpf (135 days), with three intermediate measurements (at 89, 121 and 149 dpf).

### Rearing conditions

During the treatment (10-40 dpf) and buffer periods (41-51 dpf), fish were reared in five independent water recirculating systems comprising each a 30-L aquarium and a 250-L water filtering and pumping unit. Water temperature was maintained at the dedicated temperature with a thermostat (Biotherm 2000) and 300-W heater submerged in the filtering unit. The target temperature for the thermal masculinising treatment was set at 37°C, as lower temperatures can result in variable proportions of phenotypic males in Nile tilapia from the Manzala strain (Baras et al. 2001). In other treatments, it was preferred rearing fish at 29°C, as this temperature is close to the thermal optimum for growth in Nile tilapia (Azaza et al. 2008), and it has no influence on the phenotypic sex of juveniles (for the Manzala strain, see Baras et al. 2001). In the XX-37°C treatment, temperature was increased from 29 to 37°C at 10 dpf and decreased from 37 to 29°C at 41 dpf, at a rate of about 1°C per hour, which is generally well tolerated by young Nile tilapia (Azaza et al. 2010; Rougeot et al. 2008). Water temperature was monitored every hour with data loggers (Onset Computer Corporation) immersed in the water pumping units in each of the five recirculating systems. Dissolved oxygen was maintained near saturation with air pumps. Day length was 12L:12D, with lights on at 7:30 h.

From 10 to 51 dpf fish were fed formulated feed (41% protein, 8% lipid) distributed in excess in four daily meals at 3-h intervals starting at 8:30 h. During the treatment period, the feed

distributed to the XX-Fadro and XX-17MT groups were added either fadrozole hydrochloride (Sigma-Aldrich; 500 mg kg<sup>-1</sup> feed, after Kwon et al. 2000) or 17 $\alpha$ -methyltestosterone (Sigma-Aldrich; 60 mg kg<sup>-1</sup> feed, after Macintosh and Little 1995). These compounds were dissolved in 99% ethanol prior to addition to the feed. After evaporation of ethanol, the feed was stored at 4°C. Excess food and dead fish were removed daily with a siphon.

At 51 dpf, fish from all five treatments were tagged individually (see below), measured, size-sorted to exclude excessively small or large individuals and in order that the mean sizes of fish from different treatments were as similar as possible. Fish were then transferred to the same tank (400 L, 100 x 100 x 40 cm) in another water recirculating system at 29°C under 12L:12D. Until the age of 186 dpf, fish were fed *ad libitum* twice a day (at 10.00 and 16.00 h; formulated feed, 35% protein, 18% lipid).

#### Fish measurement, tagging and sexing

At 10 and 40 dpf, fish wet body mass (WM) was measured (nearest 0.1 mg) in samples of 30 fish per treatment. Upon subsequent measurements (51, 89, 121, 149 and 186 dpf), all fish were weighed individually (nearest 0.01 g in fish < 10 g, nearest 0.1 g in larger fish) and photographed in profile view for the subsequent measurement of standard body length (SL) and body depth (BD) on the computer, using the freeware Image J (developed by Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, and available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>). All measurements were done under anaesthesia (eugenol, 0.05 mL.L<sup>-1</sup>). At 51 dpf, anaesthetised fish were tagged with standard passive integrated transponders (11 x 2 mm  $\varnothing$ , 100 mg) that were inserted into their body cavity. Fish retained for tagging were  $\geq$  5 g, because PIT-tagging has no significant effect on the growth of Nile tilapia for tag ratios < 2% (Baras et al. 1999; Ouedraogo et al. in press). At the end of the experiment (186 dpf), all survivors were anaesthetised (as above), killed with an excess dose of eugenol (0.3 mL L<sup>-1</sup>) and dissected for determining their gender through the macroscopic examination of gonads.

## Calculations and statistics

The specific growth rate (SGR, % WM day<sup>-1</sup>) was calculated as  $SGR = 100 [\ln(WM_2) - \ln(WM_1)] / (t_2 - t_1)$ , where WM<sub>2</sub> and WM<sub>1</sub> are the wet body masses of fish at times 2 and 1, respectively. The analysis of fish morphology in the different treatments was conducted as follows. Fish body depth (BD) was equated to standard body length (SL) with a simple linear regression analysis, using data from all dates of measurement (51, 89, 121, 149 and 186 dpf) in fish of the XY-29°C group (genotypic males), which served as a reference here. This equation served to calculate the expected body depth (BD<sub>E</sub>) in fish of all treatments, on the basis of the measure of SL. The ratios between the observed and expected body depths (BD<sub>O</sub>:BD<sub>E</sub>) were then calculated and compared statistically. This indirect method was preferred to the direct comparison of BD measurements or BD:SL ratios, which can vary between fish of different sizes.

Contingency table analyses were used to compare the survival rates during the treatment and common garden periods (10-40 dpf and 51-186 dpf, respectively) and the sex ratios at the end of the study. Fish WM and BD<sub>O</sub>:BD<sub>E</sub> at different ages (41, 51, 89, 121, 148 and 186 dpf) were compared with one-way analysis of variance (ANOVA). Fish SGR during the common garden experiment was analysed with repeated measures ANOVA. Scheffe F-tests were used for post hoc comparisons. Null hypotheses were rejected at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### Treatment period

Water temperature ranged from 37.0 to 37.2°C in the XX-37°C treatment and from 29.2 to 29.5°C in the other groups. Fish survival during the treatment period was very high (99-100%) in all groups, except in the XX-37°C group (46 out of 85 fish,  $P < 0.05$ ). Mortality in the XX-37°C group continued after temperature was returned to 29°C (13 survivors at 51 dpf). Growth during the treatment period was rapid in all groups (SGR of 18.7-20.1% day<sup>-1</sup>). Nevertheless, at 40 dpf fish in the 17-MT and fadrozole groups were significantly larger and XX-29°C fish (female controls) were significantly smaller than others (Table 1).

At the end of the buffer period (51 dpf), size sorting was needed to avoid excessive size dispersal and subsequent risks of marked dominance hierarchies and associated mortality during the period of communal rearing. Only fish from 6-7 g were retained, thereby reducing sample size to less than 30 fish in all treatments (Table 1).

**Table 1.** Survival and wet body mass (WM) of Nile tilapia as a function of genotype (XX or XY) and treatment (masculinisation or controls) during the treatment period (10-40 days after fertilization, dpf; groups raised separately) and period of communal rearing (51-186 dpf, 29°C). BD<sub>O</sub>:BD<sub>E</sub> is the ratio between observed and expected body depth. Values are means ± standard deviations on a particular day (WM) or all days of measurement (BD<sub>O</sub>:BD<sub>E</sub>). Masculinising treatments with elevated temperature (37°C), 17α-methyltestosterone (17MT) or fadrozole (Fadro). Fish XX-29°C and XY-29°C are the control groups for females and males, respectively. Within each line, variables that share a script in common do not differ at  $P<0.05$  (contingency table analysis for survival and sex ratio, Scheffe post hoc F-tests for WM).

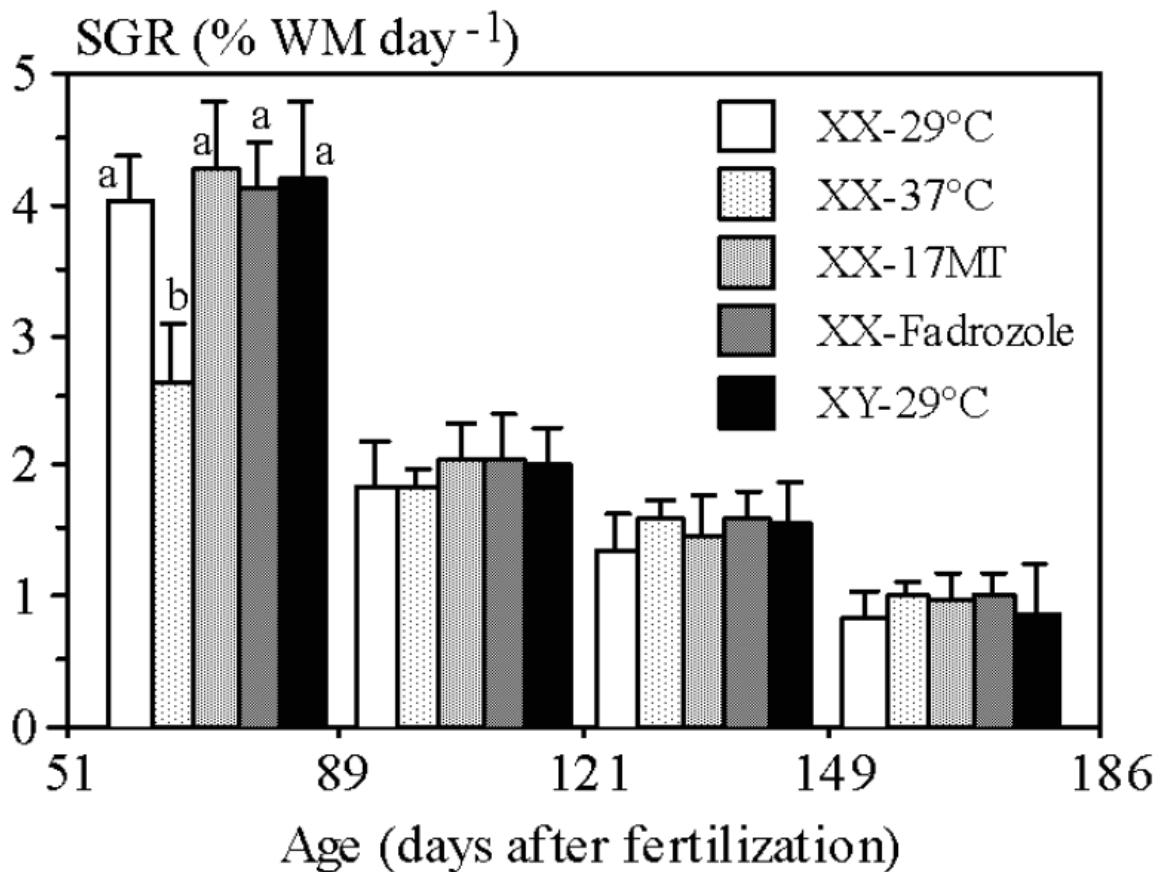
	XX-29°C	XX-37°C	XX-17MT	XX-Fadro	XY-29°C
<i>Treatment period</i>					
N fish 10 dpf	85	85	85	85	85
40 dpf	85 a	46 b	84 a	85 a	84 a
WM 10 dpf (g)	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
40 dpf (g)	3.26±0.35 a	4.01±1.14 ab	5.04±0.37 c	4.91±0.29 c	4.03±0.67 b
<i>Communal rearing</i>					
N fish 51 dpf	22	6	19	9	14
186 dpf	20 a	5 a	17 a	8 a	14 a
WM 51 dpf (g)	6.66±0.52 a	6.63±0.95 a	6.50±0.48 a	6.37±0.37 a	6.43±0.41 a
89 dpf (g)	30.1±5.4 b	17.5±4.6 a	34.0±6.3 b	31.0±4.7 b	32.2±6.9 b
121 dpf (g)	55.3±9.7 b	34.6±5.7 a	66.4±15.4 c	59.6±8.3 bc	60.8±10.8 bc
149 dpf (g)	80.5±12.6 b	53.9±8.6 a	95.8±14.1 c	93.2±13.5 bc	92.1±12.2 bc
186 dpf (g)	110.6±15.9 b	78.1±13.0 a	137.8±20.3 c	134.5±18.5 c	126.2±18.1 bc
BD <sub>O</sub> :BD <sub>E</sub>	1.014±0.035 a	1.036±0.037 a	1.027±0.040 a	1.019±0.031 a	1.007±0.035 a
Sex ratio at 186 dpf	0 M / 20 F a	4 M / 1 F b	17 M / 0 F b	8 M / 0 F b	14 M / 0 F b

### Period of communal rearing

Water temperature during the period of communal rearing ranged from 29.0 to 29.5°C. Mortality was low (6 of 70 fish over 135 days, thus 0.7‰ day<sup>-1</sup>) and did not vary between treatments (Chi square with continuity correction,  $P>0.05$ ). No mortality took place during the first three weeks following PIT-tagging, thereby suggesting that it was independent from tagging effects. All fish retained their tags until the end of the study. Sexing at 186 dph revealed that all XX-29°C fish had ovaries, and that all XY-29°C, XX-17MT and XX-Fadro fish had testes. In the XX-37°C fish, 80% were male individuals.

Growth (SGR) decreased significantly in fish of increasing age (repeated measures ANOVA,  $P<0.0001$ ) and varied between fish from different treatments, at least during the first rearing weeks (51-89 dpf), when XX-37°C fish grew at significantly ( $P<0.0001$ ) lower rates than fish from all other treatments (Fig. 1). Thereafter, SGR no longer varied significantly between treatments. Hence, XX-37°C fish remained smaller than all others throughout the experiment. The SGR of XX-29°C females was slightly lower than those of other fish (except for XX-37°C fish from 51 to 89 dpf). These slight differences cumulated over time and contributed to make XX-29°C females progressively smaller than XX-17MT and XX-Fadro males (Table 1).

As regards fish morphology, the relationship between body depth (BD) and standard body length (SL) in XY-29°C males was given by  $BD = -3.221 [0.748] + 0.417 [0.007] SL$  ( $r^2=0.985$ ), where values between brackets are the standard errors of coefficients. At all dates, the BD<sub>O</sub>:BD<sub>E</sub> ratios of XX fish were slightly higher than those of XY-29°C males (1.014-1.036 *versus* 1.007), but differences were never significant at  $P<0.05$ .



**Fig. 1.** Growth of Nile tilapia during the period of communal rearing, as a function of genotype (XX or XY) and treatment (masculinisation or controls, see Table 1). Bars and whiskers are the means and standard deviations of the individual specific growth rate (SGR, % wet body mass WM) of tagged fish. Within each period, bars with different scripts differ at  $P < 0.05$  (Scheffe post hoc F-tests).

## Discussion

As anticipated, all XX-29°C and all XY-29°C were found to be female and male individuals, respectively. The efficiency of the masculinising treatment was 100% both for 17MT and fadrozole treatments, which is consistent with the results of other studies using similar dosages (Barry et al. 2007; El-Greisy and El-Gamal 2012; Green and Teichert-Coddington 2000; Kwon et al. 2000). By contrast, not all XX fish raised at 37°C were masculinised. This is also consistent with previous studies demonstrating that not all progenies of a particular strain are equally thermosensitive (Baras et al. 2001; Baroiller et al. 2009; Baroiller et al. 1995a, 1995b; Tessema et al. 2006).



Fish mortality during the treatment period was very low (<1% over 30 days) in the controls (XX-29°C and XY-29°C), thereby emphasizing the adequacy of rearing conditions. Similar high survival rates were obtained with 17MT and fadrozole, which is consistent with previous findings on the use of these chemicals in Nile tilapia (El-Greisy and El-Gamal 2012; Kwon et al. 2000) and in other fish species (Eurasian perch *Perca fluviatilis*, Mandiki et al. 2005; common carp *Cyprinus carpio*, Tzchori et al. 2004). By contrast, only about half of the XX-37°C fish survived the treatment period, and mortality continued during the first week following the return to 29°C. Other authors also found that the survival of Nile tilapia could be reduced significantly at temperatures over 35°C (Abucay et al. 1999; Baras et al. 2001) and mortality rates were highly variable between progenies (Tessema et al. 2006) and between populations (Bezault et al. 2007).

At the end of the treatment period (40 dpf) there was a clear-cut growth dimorphism between XX-29°C and XY-29°C fish, to the detriment of females. It is well known that between-sex growth dimorphism in Nile tilapia can take place at a small size and young age, especially in rearing enclosures of small dimensions (Baras and Mélard 1997). Furthermore, evidence was provided that when males and females of Nile tilapia were reared in monosex groups, the between-sex growth dimorphism was more marked than in mixed-sex groups (Toguyéni et al. 2002). The influences of rearing environment and sex ratio are supported by the finding that during the period of communal rearing (larger tank, mixed sex ratio), the difference between the SGR of genetic males and females was less marked than during the treatment period.

Fish masculinised with 17MT grew faster than XY-29°C males during the treatment period. Similar patterns have been found in many studies and attributed to the anabolic effect of exogenous male steroids (El-Greisy and El-Gamal 2012; Mair et al. 1995) or to their positive effect on food conversion (Chakraborty and Banerjee 2010; Toguyéni et al. 1997). Here, the growth rates of fish masculinised with fadrozole and 17MT did not differ. Similar positive effects of fadrozole on growth have been reported in other fish species. For example, Tzchori et al. (2004) found that common carp fed fadrozole supplemented food (200 mg kg<sup>-1</sup>) grew faster than controls or fish receiving food supplemented with 17MT. Likewise, Mandiki et al. (2005) found that fadrozole (50 mg kg<sup>-1</sup>) had a positive effect on the growth of Eurasian perch in comparison to control fish or individuals treated with testosterone. The positive effect of fadrozole on fish growth is not surprising, as this compound inhibits the aromatisation of androgens, thereby resulting in a lower level of estrogens and a correspondingly higher level of endogenous androgens (Huffman et al. 2013). There is now some evidence that in Nile tilapia, not only do androgens have a positive effect on growth, but 17β-oestradiol (E2) also has a negative effect on growth (A. Toguyéni, J.F. Baroiller, H.



D'Cotta, A. Fostier, unpublished data), so a shift in the androgen / estrogen balance can rapidly affect growth.

Nile tilapia exposed at 37°C in the present study grew at a slower rate than XX fish masculinised with chemicals, but at the same rate as XY males. The latter result contrasts with previous studies showing that elevated temperatures had a detrimental effect on the growth of Nile tilapia (Azaza et al. 2008; Baras et al. 2001). There is some evidence that elevated temperature acted negatively on Nile tilapia here: indeed, both elevated temperature and fadrozole act as inhibitors of aromatase, and here fish treated with fadrozole grew significantly faster than those reared at 37°C. These comparisons suggest that the absence of size differences between XY-29°C and XX-37°C originated from a slower growth of the former fish rather than from a fast growth of the latter. Yet all fish originated from the same batch of eggs, but the XY-29°C fish were sired by male parents that differed from those for the other four groups. Growth is a heritable trait in Nile tilapia (Charo-Karisa et al. 2006), and the growth capacities of the male parents were not evaluated here. However, evidence has been provided that YY males can grow at a slower rate than XX and XY males in Nile tilapia (Toguyéni et al. 2002). It is thus possible that the relatively slow growth of XY-29°C fish during the treatment period originated from a paternal effect.

During the period of communal rearing, the growth dimorphism between genetic males and females was more limited than before (see above). Likewise, the growth rates of XY males and those of XX fish masculinised with chemicals were similar, thereby suggesting that the differences observed during the treatment period originated from an anabolic effect of exogenous (for 17MT) or endogenous steroids (for fadrozole) (or from the effect of these chemicals on estrogen levels). By contrast, during the first weeks of communal rearing XX-37°C fish had a slower growth than all others. In general, the transition from an excessively warm temperature to a thermal regime closer to the thermal optimum for growth is accompanied with some growth overshoot (for Nile tilapia, see Baras et al. 2001) and not with depressed growth. It is possible that the difference observed here originated from the size-sorting operation that was conducted just before the start of the common garden experiment. By then, there was substantial size dispersal among XX-37°C fish and only the smallest individuals fell in the adequate size range. It is possible that within a small group (13 survivors at 51 dpf) these small fish were subordinate individuals, and that this initial status contributed to slow their subsequent growth during the first days or weeks of communal rearing. Thereafter, their growth rebounded and became similar to those of other male fish, as dominance hierarchies were presumably less marked in a large group of fish (which is supported by the limited growth dispersal throughout the period of communal rearing).

In conclusion, except for the slower growth of XX-37°C fish following the return to standard rearing temperature, the three masculinisation techniques provided similar results in terms of growth and survival when performances were evaluated in a context of communal rearing. This is an encouraging perspective for using elevated temperatures as an alternative method for masculinising Nile tilapia, especially in view of the hazards associated with the use of steroids or other chemicals, in particular fadrozole that is reputedly carcinogenic. Yet, the present results should be viewed as preliminary, because the study was conducted with low fish numbers originating from a restricted number of broodfish, and it halted before fish attained market size. Further studies should be conducted to bridge this gap. Ideally, these studies should use fish lines selected for thermosensitivity, in order to maximise the masculinising efficiency of the thermal treatment and minimize the mortality incurred during the treatment period, which can be a limitation to fish production in a species with a relatively low fecundity.

## **Acknowledgements**

Christian Ouedraogo benefited from a grant from the French Ministry of Foreign Affairs for his PhD research in France. Mrs. Dominique Caseau-Baras contributed to improve the English style of the manuscript. Etienne Baras is an honorary research associate of the Belgian National Foundation for Scientific Research.

Brain masculinisation shows different *cyp19a1B*  
and *amh* expression profiles between genetic  
XY males, 17 $\alpha$ -methyltestosterone, temperature  
and fadrozole induced XX males of tilapia  
*Oreochromis niloticus*

Chapitre  
4

Ouedraogo C.  
Baroiller J.F.  
Pepey E.  
Canonne M.  
D'Cotta H.



Molecular Reproduction & Development, soumis

## ABSTRACT

To understand the sexualisation of the tilapia brain, we analysed changes in *cyp19a1B*, *era*, *erb* and *amh* gene expressions between genetic males (XY-27) and females (XX-27) and assessed effects of three masculinising treatments applied during gonadal sex-differentiation from 10 to 40 days post-fertilisation (dpf). XY-27 males (100% males) had a dimorphic *amh* expression already at 14 dpf which persisted to adulthood, slightly higher *cyp19a1B* expression than females but no differences in *era* and *erb*. Very rapid changes were seen in the high temperature-induced 90.3% males with a 30 fold-up regulation in *cyp19a1B* expression, together with high *era*, *erb* and *amh* expressions. The 17  $\alpha$ -methyltestosterone 100% induced males had similar *cyp19a1B*, *era* and *erb* expressions to XY-27 males but low *amh* levels like females. In contrast, males treated with the aromatase-inhibitor fadrozole showed suppression of *amh* expression which persisted even after the lifting of the inhibition at 31 dpf. After this stage, both *cyp19a1B* and *era* were strongly up-regulated in these fadrozole-males. These results suggest that *cyp19a1B* either directly or indirectly regulates brain *amh* of tilapia. The masculinising treatments applied during development disrupted differently but rapidly the endocrine network of female brain with some of these changes persisting to adulthood. Overall, temperature-induced males and fadrozole males resembled more genetic males than 17MT males. Whatever the genetic or phenotypic sex, *cyp19a1B* expression increased with adulthood, and presumably activity, probably reflecting fish neurogenesis which might contribute to their sexual plasticity.

**Keywords:** estrogens, androgens, sex-differentiation

## INTRODUCTION

In tilapia sex determination relies upon the interactions between major and minor genetic factors and temperature influence (Baroiller et al., 2009). Elevated temperatures can override the genetic sex of XX tilapia inducing functional male phenotypes (Baroiller et al; 1995). In addition in tilapia like in many teleosts, the genetic sex can be overridden with androgen

treatments giving male phenotypes while estrogens such as 17 $\beta$ -estradiol (E2) induce female phenotypes (Baroiller et al., 1999; Devlin and Nagahama, 2002; Kobayashi et al., 2003; Kobayashi and Iwamatsu, 2005). Tilapia differentiating testes have been shown to have low levels of E2 but also of 11-ketotestosterone (11KT), the major androgen found in fish (D'Cotta et al., 2001a; b). In contrast, differentiating ovaries have elevated E2 levels (D'Cotta et al., 2001a; Baroiller and D'Cotta, 2001). Male phenotypes have been produced in a number of teleost by blocking estrogen synthesis with inhibitors of the aromatase enzyme (*cyp19*) that catalyzes the conversion of androgens into estrogens (Afonso et al., 2001; Guiguen et al., 1999; Kwon et al., 2000; Paul-Prasanth et al., 2013). E2 can act on phenotypic males blocking the effects of temperature-induction or aromatase-inhibition (AI) (Kitano et al., 2012; Paul-Prasanth et al., 2013). Together, these results have demonstrated the critical role of estrogens, being major endocrine factors defining gonadal sex-fate as their synthesis is required to trigger ovarian differentiation and their depletion is sufficient to trigger testicular development. Furthermore, the gene coding the aromatase protein has been shown to be critical in ovarian differentiation. In most teleosts including tilapia there are two aromatase genes (*cyp19a1A* and *cyp19a1B*) originated during the genome duplication of ray-finned fish (Tchoudakova and Callard, 1998; Chang et al., 2005). The *cyp19a1A* gene is mainly found in the gonads while the *cyp19a1B* is predominantly expressed in the brain, but an overlap or switch in this distribution has been seen, such as in several East African cichlids (Böhne et al., 2013). Most frequently it is the gonadal gene *cyp19a1A* which increases its expression during ovarian differentiation of many fish species including the Nile tilapia (Guiguen et al., 1999; D'Cotta et al., 2001; Kwon et al., 2001; Ijiri et al., 2008; Guiguen et al., 2010).

Masculinisation induced by high temperatures or androgen treatments suppresses *cyp19a1A* expression in tilapia whilst AI inhibits the enzyme activity (D'Cotta et al., 2001; Kwon et al., 2001; Bhandari et al., 2006b; Ijiri et al., 2008), all resulting presumably in the absence of estrogen synthesis and a subsequent testis development. Treatments with tamoxifen which blocks the estrogen receptors also causes a decrease in *cyp19a1A* expression with testis development in tilapia (Zhang et al., 2010), Japanese flounder (Kitano et al., 2007) as well as in the southern catfish (Liu et al., 2007). Three nuclear estrogen receptors (ER/er) genes *era*, *er $\beta$ -I* and *er $\beta$ -II* have been found in teleost fish (Hawkins et al., 2000). Despite the importance of ER in ovarian differentiation, all the ERs genes were expressed similarly in tilapia female and males during gonad differentiation (Ijiri et al., 2008). Likewise, the two androgen receptors (AR/ar) *ara* and *arb* were not dimorphic although expressed at lower levels than the *ers* (Ijiri et al., 2008).



Sex differentiation of the vertebrate brain during embryo development is now known to be mediated not only by gonadal steroids but also by genes on the sex chromosomes as well as epigenetic regulations (McCarthy and Arnold, 2011). In mammals, gonadal testosterone in the developing brain is partially aromatized into estradiol and by binding to its receptor induces male organizational changes, a masculinisation/defeminisation that are irreversible, affecting male reproduction and adult behaviour (Wilson and Davies, 2007; Nugent and McCarthy, 2011). In contrast, the masculinisation or feminisation of the developing brain in teleost is reversible, showing plasticity even in adulthood (Godwin, 2010; Paul-Prasanth et al., 2013). Furthermore, in the teleost brain there is a very high estrogen biosynthesis in adults with an aromatase activity that apparently increases with age and steroid levels (Callard et al., 1990; Piferrer and Blazquez, 2005; Diotel et al., 2011). Knowledge on the sexual differentiation of fish brain is scarce since studies have been conducted in adults and centred on the regulation or endocrine disruption of sexual reproductive cycles (Diotel et al., 2010; Cheshenko et al., 2008). Differentiating males had overall higher *cyp19a1b* expression in developing rainbow trout brains (Vizziano-Cantonnet et al., 2011). In tilapia brains, females had higher aromatase activity than males during the onset of gonadal sex-differentiation (D'Cotta et al., 2001), although no sex-differences were seen for *cyp19a1b* expression (Kwon et al., 2001; Chang et al., 2005). Recently in developing medaka brains, the ventral telencephalic and preoptic regions showed strong female-specific expressions of ERs and ARs which were activated by estrogens and inhibited by androgens (Hiraki et al., 2012).

An interesting feature of tilapia brain during sex differentiation is the male-specific expression of the anti-müllerian hormone gene (*amh*) (Poonlaphdecha et al., 2011). Amh plays a primordial role in the development of testis in non-teleost vertebrates, suppressing the Müllerian ducts (Josso et al., 1993; Munsterberg and Lovell-Badge, 1999). The role of amh in gonads and more particularly in tilapia brain is not clear. Amh may be exerting a negative control on estrogen production by inhibiting aromatase activity such as observed in the ovine fetal ovaries treated *in vitro* with Amh (Vigier et al., 1989).

We wanted to test the molecular modifications occurring in the tilapia brain in fish exposed to different masculinizing treatments applied during sex differentiation. In this study we analysed *cyp19a1b*, *era*, *erb* and *amh* to assess how they were affected by these treatments. We were interested in comparing the molecular pathways in the brain between genetic females and genetic males, and with phenotypic males to try to better understand the sexualisation of the developing tilapia brain.

## RESULTS

### Treatments efficiencies

In the genetic XY males the sex-ratio was of 100% males (Table 2) whereas females had 0% males. The sex-ratios of both the fadrozole group (XX-Fadro) and the 17MT-treated fish (XX-17MT) were of 100% males, while the temperature-treated (XX-36°C) had 90.3% males.

**Table 2: Sex-ratios in the whole groups**

Treatment	XY 27°C	XX 27°C	XX 36°C	XX Fadro	XX 17MT
% males	100	0	90.3	100	100

### Brain aromatase *cyp19a1B* gene expression

Gene expressions were analysed at three sampling periods: at 14 dpf corresponding to the beginning of sex differentiation, at 31 dpf towards the end of the treatments and at 110 dpf when individuals are considered to be mature. At 14 dpf the gonads are still bipotential but it comprises the critical period when they are labile to sex-reversal with the external factors of high temperatures, fadrozole and 17MT (D'Cotta et al., 2001; Baroiller et al., 2009). At 31 dpf ovarian meiosis has already started while testes are undergoing gonial mitosis (D'Cotta et al., 2001; Nakamura, 2013). At 110 dpf males are in spermatogenesis while females are in pre or vitellogenesis (D'Cotta et al., 2001).

*Cyp19a1B* gene expression at 14 dpf (Fig.1A) was significantly higher ( $p<0.0001$ ) in the XX-36°C fish, whereas the XX-Fadro and the XX-17MT had similar expressions than the genetic males (XY-27°C) and the genetic females (XX-27°C) which had the lowest levels. At 31dpf *cyp19a1B* expression (Fig. 1B) was still elevated for the XX-36°C compared to the XX-17MT ( $p=0.001$ ) and genetic XY-males ( $p=0.004$ ). Expression increased in the XX-Fadro males reaching even higher levels to what was observed in the XX-36°C fish ( $p=0.811$ ) while the rest of the induced males had similar expression level than the genetic males and genetic

females (Fig. 1B). At 110 dpf (Fig. 1C) *cyp19a1b* gene expression continued to be elevated for both XX-36°C and XX-Fadro males. Levels were significantly different from the XX-17MT ( $p<0.01$ ) and the genetic females ( $p<0.002$ ) but not from the genetic males. Therefore, during the 3 stages the brain aromatase gene expressions remained higher in the XX-36°C with XX-Fadro males reaching even higher levels at 31 dpf which remained elevated (Fig. 1D). The genetic XX females (XX-27°C) showed always the lowest levels.

### **Analysis of the Anti-Müllerian hormone (*amh*) expression**

*Amh* gene expression was always significantly higher in genetic males than in genetic females at the three stages (Fig. 2), notably at 14 dpf ( $p<0.0001$ ) (Fig. 2A) and at 110 dpf ( $p<0.0001$ ) (Fig. 2C). *Amh* expression in genetic males was also stronger than in all the XX treated fish especially at both 14 and 110 dpf (Fig. 2D). The second highest *amh* expression was found for the XX-36°C group with significantly different levels than genetic males at 14 dpf ( $p<0.0001$ ) (Fig. 2A) as well as 110 dpf ( $p<0.0001$ ) (Fig. 2C). The XX-17MT males had lower levels than the XX-36°C fish at both 14 dpf ( $p=0.598$ ) and 110 dpf ( $p=0.001$ ) but surprising showed a peak at 31 dpf ( $p=0.85$ ). In contrast, the fadrozole males XX-Fadro males presented extremely low *amh* expressions throughout the sampling dates (Fig. 2D), with values that were even lower than the levels found for genetic females although not significantly different.

### **Estrogen receptors *era* and *erb* expression profiles**

Like what was seen for *cyp19a1b* expression, higher *erb* expression was also found for the XX-36°C fish at all stages (Fig. 4D) which was not the case for the *era* expression in which XX-Fad levels became slightly higher from 31 dpf onwards (Fig. 3D). At 14 dpf *era* gene expression was highest for the XX-36°C fish (Fig. 3A) followed by the XX-Fad and then the XX-27°C females but none were significantly different. Levels in all the phenotypic males became higher at 31 dpf (Fig. 3B) particularly for the XX-36°C fish and the XX-Fad males ( $p<0.0005$ ), while the levels for the XX-17MT males were higher but not significantly different from both genetic males and females. At 110 dpf (Fig. 3C) expression levels were higher for the XX-Fad ( $p<0.0001$ ) than the XX-36°C, and these last were higher than the XX-



17MT males ( $p<0.0001$ ) and the genetic males ( $p=0.002$ ). In all the three stages *era* levels were similar between genetic males and females (Fig. 3D).

Regarding the *erβ*, at 14dpf the XX-36°C fish had elevated expressions (Fig. 4A) while the other treated fish had comparable levels to the genetic males and the XX-Fadro treated fish (Fig. 4A). At 31 dpf (Fig. 4B) XX-36°C continued to have the highest levels compared to the rest ( $p<0.0001$ ) but expressions increased for all the other groups with the highest levels observed for the XX-17MT males with similar levels found for genetic males. At 110 dpf (Fig. 4C) XX-36°C levels were still the highest ( $p<0.0001$ ) while the rest had comparable expression levels. Genetic males had from 31 dpf onwards higher levels than genetic females although they were not significant (Fig. 4D).

## DISCUSSION

In this study we analysed whether genetic sex differences existed in tilapia brain during development and whether they persisted to adulthood studying the expressions of the *cyp19a1B*, *era*, *erβ* and *amh* genes, as well as assessing in the brain the effects of masculinising treatments applied during the sexualisation of the gonad. The use of all-male (XY) and all-female (XX) progenies allowed us to study developing tilapia larvae before sex could be identified. This study was not focused on behavioural changes but more on the physiological/endocrine environment between males and females and the comparison between phenotypic males produced by sex reversal treatments.

Testosterone in several vertebrate species exerts in the brain many physiological actions affecting male-sexual behaviours that are mediated by the aromatase neural conversion of androgens into estrogens and therefore, the brain aromatase is a critical factor in the masculinisation of the brain (Balthazart et al., 2011; Nugent and McCarthy, 2011). In the present study, we only distinguished a slightly higher *cyp19a1B* gene expression in the brain of XY male tilapia compared to XX females during development which persisted throughout the life stages analysed. *Cyp19a1B* is already expressed at 4 dpf in the tilapia brain when the gonad is not yet formed, and no sex dimorphism was previously observed when using a less sensitive method than qPCR (Kwon et al., 2001; Chang et al., 2005). In contrast to genetic males, we found that temperature-induced males had a dimorphic expression of *cyp19a1B* with respect to females. These phenotypic males had a rapid and prolonged increase of *cyp19a1B* gene expression already evident at 14 dpf just four days after the initiation of the

treatments. When compared to females, temperature caused a very drastic ~30 fold increase in *cyp19a1B* gene expression. Hence, the *cyp19a1B* gene appears to be extremely thermo-sensitive. These results indicate that temperature masculinisation of tilapia does not affect in a similar manner the gonadal *cyp19a1A* and the brain aromatase *cyp19a1B* genes since temperature-masculinisation caused a suppression of *cyp19a1A* expression at 18 dpf (D'Cotta et al., 2001; Poonlaphdecha et al., 2013).

The low or no dimorphic *cyp19a1B* transcripts between genetic males and females is not correlated with the two-fold higher aromatase activity of females (377.9 pmol/head/hr) compared to males, that we previously saw in the tilapia brain during gonadal sex-differentiation (D'Cotta et al., 2001). There is no correlation either between the elevated *cyp19a1B* expression levels of the temperature-induced phenotypic males with the three-fold decrease in the aromatase activity that we previously saw in tilapia brain of temperature-masculinised fish (D'Cotta et al., 2001). Aromatase activity can be modulated not only by gene transcription (genomic) but also by translational and post-translational mechanisms (non-genomic) controlling the protein and the enzyme activity (Balthazart et al., 2011). Discrepancies between aromatase activities, the number of aromatase immunoreactive cells as well as mRNA levels have been evidenced in the quail brain (Balthazart et al., 2011). Males had a basal aromatase activity that was two-fold higher than females but this did not reflect any sex-differences in mRNA levels (Balthazart et al., 2011). These authors suggested a sex difference in the regulation of aromatase activity, at least partly, by the intracellular ionic environment between males and females. It is unclear what are the mechanisms underlying the discrepancies between aromatase mRNAs and activity found in tilapia brain. The expression analyses in the present study were carried out in homogenized heads or brain giving an overall brain expression. This may not reflect the accurate sex-differences in aromatase activity or *cyp19a1B* expressions in certain specific nuclei.

Developmental sex differences have been studied in the brain of few teleosts. In catfish, females had higher brain *cyp19a1B* expression and activity at the onset of morphological sex-differentiation of the gonad, while expression and activity could only be detected in males after sex differentiation (Rasheeda et al., 2010). Likewise, sea bass females had higher brain *cyp19a1B* gene expression than males during morphological sex-differentiation but after this, a switch occurred and mRNA increased in males (Blazquez and Piferrer 2004) in correlation with their aromatase activity (González and Piferrer, 2003). In contrast, males of rainbow trout had higher brain *cyp19a1B* transcripts and aromatase activity during the molecular sex-differentiation of the gonad but not after (Vizziano-Cantonnet et al., 2011). However, in medaka brain no sex-biased *cyp19a1B* expression was seen during sex-differentiation but

adult females had higher expression than males (Patil and Gunasekera, 2008). Likewise no sexual dimorphism was seen in zebrafish for neither *cyp19a1B* expression nor protein localisation during and after the morphological sex-differentiation (Kallivretaki et al., 2007).

The blocking of estrogen production by fadrozole treatments in our study did not affect the *cyp19a1B* expression in the brain since it was already 6.8 fold higher than females at 14 dpf after 4 days of treatment, reaching similarly elevated levels to temperature-induced males. The *in vivo* inhibition of aromatase with fadrozole at the dose used caused development of testes giving complete sex-reversals. Lower doses of fadrozole have been effective to sex-reverse tilapia during sex differentiation (Alfonso et al., 2001; Kwon et al., 2001; Zhang et al., 2010). We presume that the aromatase inhibitor not only blocked estrogen production in the gonad but was also effective in the brain. We cannot however exclude that it is the reduction of estrogens in the gonad that is acting on the brain, although at 14 dpf the gonadal *cyp19a1A* expression is still relatively low (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013) and there are reduced immunoreactive cells (Devlin and Nagahama, 2002) suggesting no or low estrogen synthesis. In fact at 14 dpf the gonads are still undifferentiated whereas the brain appears to be capable to synthesize estrogens.

The cell types expressing aromatase are the radial glial cells which are progenitor cells capable of generating new neurons (Forlano et al., 2001?; Diotel et al., 2010). Aromatase activity is 100 to 1000 higher in teleosts brain than other vertebrates (Callard et al., 1990) and it seems to increase with age due to a continuous neurogenesis (Piferrer and Blazquez, 2005; Diotel et al., 2010). The present study corroborates this, because *cyp19a1B* expression increased with age whatever the genotypic or phenotypic sex. In fact adult females reached a 133 fold-increase (the highest fold) compared to their expression at 14 dpf. We presume that higher transcription involves higher amount of enzyme molecules and thus enzyme activity.

The *cyp19a1B* gene is regulated *via* estrogen action by binding and activating their receptors (ER) and then interacting with estrogen-responsive elements (ERE) situated on the *cyp19a1B* promoter (Chang et al., 2005; Diotel et al., 2010). Apart from ERE the *cyp19a1B* promoter in many teleosts including tilapia contains several putative sites for different families of transcription factors Sox, Hox, Fox, nr5a1b (SF1) involved in steroid synthesis as well as an androgen ARE (Böhne et al., 2013). We focused the present study on the estrogen receptors analysing the *era* and *erb* expressions, and found that they were not sexually dimorphic between genetic males and genetic females at none of the three stages studied even when fish were mature. These fish were not reproducing which may account for the lack of differential expressions. Mature tilapia males have increased circulating levels of both 11-

ketotestosterone (11KT; non-aromatisable) and testosterone (Oliveira, 2009), while reproducing females show higher amounts of E2 and testosterone (Tacon et al., 2000). During vitellogenesis female Mozambican tilapia *O. mossambicus* had higher brain *era* and *erb* expressions than males (Davis et al., 2008). In rainbow trout *esr1*, *esr2a*, and *esr2b* gene expressions increased in male brains parallel to *cyp19a1B* expression and activity during sex differentiation but this dimorphism was then lost (Vizziano-Cantonnet et al., 2011). In the medaka female-specific expressions of ERs and ARs were found in nuclei in the ventral telencephalic and preoptic areas from development increasing with maturity, with higher *esr2b* expression in developing females whereas at the spawning season, *esr2a* expression was higher in males (Hiraki et al., 2012). In contrast to mammals and birds, *esr1* had a male-biased expression suggesting that it has a role in the masculinisation or defeminisation in medaka while *esr2b* and *ar b* in feminisation or demasculinisation (Hiraki et al., 2012). Activation of female-specific AR and ER sites occurred with E2 but decreased with 11KT (Hiraki et al., 2012).

Our study showed that temperature-induced males had always substantially higher *era* and *erb* expressions than the rest of the phenotypic males. In mixed progenies of Mozambique tilapia, *O. mossambicus*, the development stage and temperature treatments caused differences in brain *cyp19a1B*, *era* and *erb* expressions. Treatment at 32°C temperatures after 14 dpf was associated with increase in male proportion and *era* expression, whereas low temperatures of 20°C before 14 dpf showed lower *cyp19a1B* and *era* expressions correlated with higher female proportion (Wang and Tsai, 2000; Tsai et al., 2003). In the pejerrey where sex is strongly influenced by temperature, *cyp19a1B* expression increased at male promoting temperatures preceding the onset of gonad sex-differentiation, while *erb* expression increased later (6 weeks) but at all other stages levels were not significant (Strobl-Mazzulla et al., 2008). In adults however, E2 treatments caused increases in *cyp19a1B*, *era* and *erb* expressions (Strobl-Mazzulla et al., 2008).

Fadrozole induced males had elevated levels of *era* expression whilst the *erb* expression was affected presumably by the estrogen blockage since expression remained low. Interestingly, the present study showed marked differences between the phenotypic males. Overall, the temperature-induced and fadrozole-induced males showed larger similarities in the *cyp19a1B* and *era* expression profiles. In contrast, males induced with 17MT had distinct expression profiles. In larvae brains they had low *cyp19a1B*, *era* and *erb* expression but in juveniles and adults they had *cyp19a1B* and *erb* expressions comparable to genetic males. These results suggesting that the masculinisation of these fish was differently regulated, with the temperature and fadrozole-males showing a different response to the 17MT-males. The

disruption and rearrangement of the sex differentiating network in the brain does not occur at the same level therefore, the gene endocrine environment is probably different between temperature/fadrozole and 17 MT treated males.

In the present study we reconfirmed that genetic XY males of tilapia have an elevated *amh* expression in their brains at 14 dpf, when the gonad is still undifferentiated, considered to be the critical period when the sex is being “decided” (Poonlaphdecha et al., 2011). This *amh* brain dimorphism appears before gonadal *amh* expression and we hypothesise that it is related to the process of masculinisation of the brain during tilapia development. We found that the male-biased *amh* expression persisted to tilapia maturity. Interestingly, *amh* expression also increased in the brain of temperature-induced males at 14 dpf and together with the 17MT-induced males resembled levels of genetic males at the end of the masculinizing treatments (31 dpf). Currently we do not know what the role of *amh* in the brain of tilapia is. Accumulating studies show that *amh* has a broader role during sex-differentiation than previously suggested. In teleosts *amh* does not have an anti-mullerian role since these ducts are absent, but *amh* appears crucial for testis differentiation. In tilapia testis, *amh* is up-regulated after *dmrt1* (Ijiri et al., 2008) although simultaneously in temperature-induced males (Poonlaphdecha et al., 2013). A duplicated *amh* (*amhy*) gene has become the master determining gene in the pejerrey (Hattori et al., 2012). *Amh* signalling via its receptor (*amhr2*) is also important since *amhr2* mutation in the medaka *hotei* causes a dysfunction of germ cell proliferation leading to sex-reversal (Nakamura et al., 2012). A SNP allele for *amhr2* is the only polymorphism associated with males in *fugu* (Kamiya et al., 2012). In mammals, *Amh* appears to mediate many brain male-biased nuclei and behaviour (Wang et al., 2009; Wittmann and McLennan, 2013). In contrast to tilapia, *Amh* is not expressed in developing mice but it is the *Amhr2* which is expressed in developing neurons (Wang et al., 2009).

Interestingly in our study, fadrozole inhibition of aromatase activity did not affect the transcription of brain aromatase but it did affect *amh* gene expression, which was completely suppressed, remaining suppressed even after the lifting of the aromatase enzyme inhibition. These results indicate that aromatase either directly or indirectly regulates brain *amh* expression in tilapia. This action may be due to neural reduction of estrogen synthesis. This contrasts with the *Amh* inhibitory action on *cyp19* when administrated to ovine fetal ovaries (Vigier et al., 1989). In rats *Cyp19* transcription was stimulated in granulosa cells by the gonadotropin follicle-stimulating hormone FSH through the cAMP and the promoter binding of the CRE-binding protein (Fitzpatrick & Richards, 1994). Transient transfection assays showed that *foxL2* and a cAMP analog can activate the *cyp19a1a* transcription *via* the

signaling of the gonadotropin FSH by suppressing its receptor *fshr* in the gonads of sexually differentiating Japanese flounder (Yamaguchi et al., 2007). FSH induces AMH stimulation in fetal males of mammals *via* Sertoli cell proliferation as well as increased transcription but later in puberty testosterone acting *via* androgen receptors overrules the FSH induction (Josso et al., 2013). The nuclear receptor Ad4BP/SF-1 can mediate in mammals the sexually dimorphic expression of AMH by binding to its promoter (Giuli, et al., 1997). It can also bind to the aromatase promoter and regulate ovarian *cyp19a1* expression in both mammals (Lynch et al., 1993), and teleosts (Yoshiura et al., 2003). Whether some of these regulatory pathways occur in tilapia brain has still to be analysed. More detailed studies are necessary to describe the role, distribution and localization of *amh* as well as the *cyp19a1B* and the ERs proteins within specific brain regions of tilapia.

Aromatase has been localised in the hypothalamus, pituitary and abundantly in the forebrain preoptic area, regions related to reproduction, aggressiveness and behaviour (Forlano et al., 2006; Diotel et al., 2010). The preoptic region has some of the most sexually dimorphic nuclei and where *amh* signaling seems to mediate many developing behaviour changes (Wittmann and McLennan, 2013). We do not know whether the fadrozole inhibition of *amh* had any effect on tilapia reproductive behaviour. Brain studies on phenotypic males have been centred on adult fish because many display behaviour plasticity with respect to reproductive tactics such as vocalisation, colouration and social status. Like in mammals, in these fish species the brain aromatization of androgens into estrogens plays a role in their male behaviour (Forlano et al., 2005). Cichlids have a complex reproductive behaviour and parental care (guarding and mouthbrooding). Like tilapia, the *Astatotilapia burtoni* cichlid has two male phenotypes showing behaviour plasticity according to their social status (dominant *vs* subordinate). Fadrozole treatment of dominant males caused a decrease in aggressive behaviour presumably due to effective blocking of brain aromatase since lower estradiol levels were obtained, with higher aromatase expression in the preoptic area (Huffman et al., 2013). It would be worthwhile to study possible aggressiveness and reproductive behaviour in tilapia after different masculinising treatments.

In conclusion, this study shows that gonad masculinisation both genetically and induced by external factors affects very quickly the overall brain. The brain masculinization of tilapia precedes or is simultaneous to gonad sex-differentiation, and it seems to require an up-regulation of *amh* in both genetic and phenotypic males. A prerequisite of masculinization seems likely to also need up-regulation of *cyp19a1B* transcripts and at least one of its receptors, although this was not very evident in genetic males. The masculinising treatments during development disrupted differently the female brain endocrine environment with some



of these changes persisting to adulthood. Overall, temperature-induced males and fadrozole males resembled more genetic males than 17MT males. Finally brain aromatase expression increases and presumably activity with adulthood, whatever the genetic or phenotypic sex probably reflecting fish neurogenesis which might contribute to fish sexual plasticity.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and samplings**

All-females XX progenies were produced by fertilising a pool of eggs from several XX synchronised females with a pool of sperms from several XX males. In addition, an all genetic XY male progeny were produced by fertilising part of the same pool of eggs with a pool of sperm from several YY males. Pools were used in order to limit family effects. After artificial fertilisation the eggs were incubated at 27°C, kept at a constant photoperiod (12:12) and fed *ad libitum* from 10 days post fertilisation (dpf) onwards. The all-female XX individuals were divided into four groups: a control reared at 27°C, a group treated to 36°C temperature (XX-36°C), a fadrozole group treated at 500 mg/kg of feed (XX-Fadro), and a 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT) treated at 60mg/kg of feed. Fadrozole and the 17MT were first dissolved in 99% ethanol and this was then added to the feed. After evaporation the feed was conserved at 4°C. A fifth group consisting in all-male XY fish reared at 27°C served as a male control. The treatments started at 10 dpf and lasted 30 days. Following euthanasia by high doses of Eugenol, heads were sampled at 14dpf, and then brains were excised at 31dpf and at 110dpf (n=8/group/dpf except at 110 dpf for the genetic males where n=3). About 100 individuals per group were kept and sexed after 3 months to verify the progenies sex ratios and the efficiency of the treatments. Sexing was performed by macroscopic observation of the gonads and several additional sex squashes. All work on animals was conducted according to the Cirad stipulations and to the French regulations on animal welfare.

## Total RNA extraction, DNase treatment and reverse transcription

Total RNA was extracted from the individual heads or brains using the TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The heads were homogenised with a tissue lyser, (Tissuelyser II Retsch- Qiagen) and the brains with IKA-T10 Ultra-Turrax (Germany). Total RNA obtained from the tissues were resuspended in 20µl (14dpf), 30µl (31dpf) and 40µl (110 dpf) of RNase-free water. Quantification of the RNA was assessed by Nanodrop and RNA integrity was evaluated on a 1% agarose gel. Two µg total RNA from the heads and 3 µg for the brain were then incubated at 37°C for 30 minutes with 0.5 TURBO DNase (Ambion, Austin, Texas, USA) to remove possible genomic DNA. EDTA was then added to a final concentration of 5mM, and the DNase was inactivated by heating at 75°C for 10 minutes. First strand cDNA was reversed transcribed with oligo (dT)<sub>12-18</sub> primers, RNaseOUT using the SuperScript™ II (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) carried out at 42°C for 60 minutes and then inactivated by heating at 70°C for 15 minutes.

## Quantitative real-time PCR analysis

Real-time PCR was performed using a Stratagene MX3000P qPCR system (Stratagene, La Jolla, CA). The primers used are shown in table 1. All primers had a T<sub>m</sub> of 60°C. *Efl* was used as a reference gene for standardization of expression levels. PCR reactions were performed in 10µl with 300nM of each primer using the Brilliant II SYBR-Green qPCR Master Mix (Agilent technologies, France). Reactions were carried out using 40ng cDNA per well and run in duplicates for each sample at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 30 s, 60°C or 64°C for 30 s and 72°C for 30 s, and with a dissociation at 95°C for 1 min, 55°C for 30 s and 95°C for 30 s. For each qPCR reaction none template control (NTC) were systematically amplified. Primer specificity was verified by a final dissociation curve in which a single peak was obtained. The cycle threshold (*Ct*) was calculated for the average of two duplicates analysis performed for each sample. The amplification efficiency (*E*) was calculated from gene-specific standard curves performed on a serially diluted PCR product and calculated according to the equation  $E=10^{(-1/\text{slope})}$ . Expression amounts were calculated from a modified  $\Delta Ct$  method which takes into consideration different PCR efficiencies, expressed as Mean Normalisation Expression (MNE) calculated according to the equation  $MNE_{\text{target}} = (E_{\text{reference}})^{Ct_{\text{reference}}} / (E_{\text{target}})^{Ct_{\text{target}}}$ .



Relative expression amounts were then expressed as the percentage Maximum MNE value ( $=\text{MNE}_{\text{target}} \times 100 / \text{MNE}_{\text{maximum}}$ ).

**Table 1: Primers used for the quantitative real-time PCR**

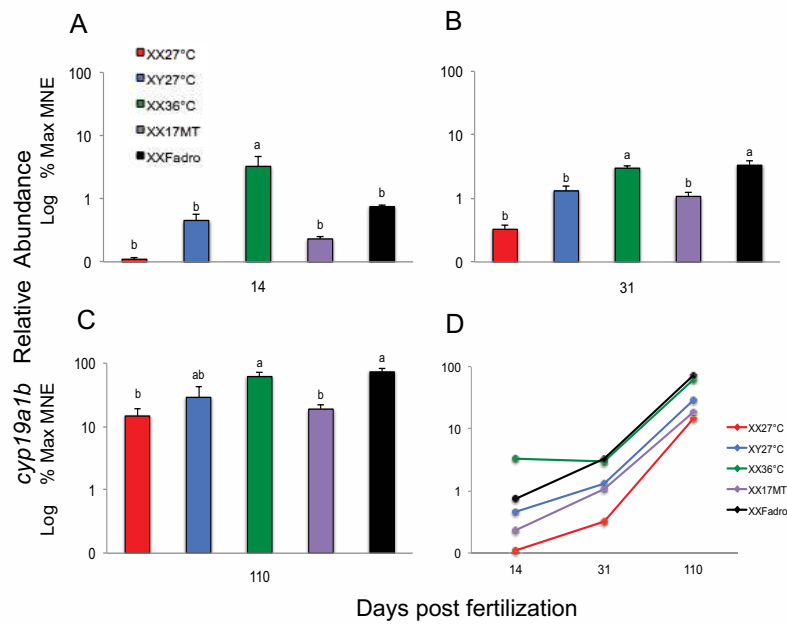
Gene name	GenBank Accession N°	Primer name and position	Primer Sequence (5' to 3')	Product bp
<i>cyp19a1B</i>	NM001279590	F957 R1184	GATTCATGAAGCCGAGAAGC TTCAAGATGGTGTTCATCATCTCCT	227
<i>amh</i>	EF512167	F1577 R1741	AAGCAGCGCAAACATTAACA GTTCCAGTCCACAACCTCCA	169
<i>er<math>\alpha</math></i> (= <i>er1</i> )	NM001279770	F2542 R2676	AGTTGGCTGTTTGTGTTGGTAACG AGTCTCTCTGCTAACCACACACG	135
<i>er<math>\beta</math></i> (= <i>er2</i> )	NM001279774	F3173 R3276	CACAGGCAGTCTAACTCCTCCAG CCCGTCTCCTAGTATTCACCATCC	104
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	NM001279647	F832 R1072	TGTTGAGACTGGTATCCTGAAGCC GATGATGACCTGAGCGTTGAAGC	240

## Data analysis

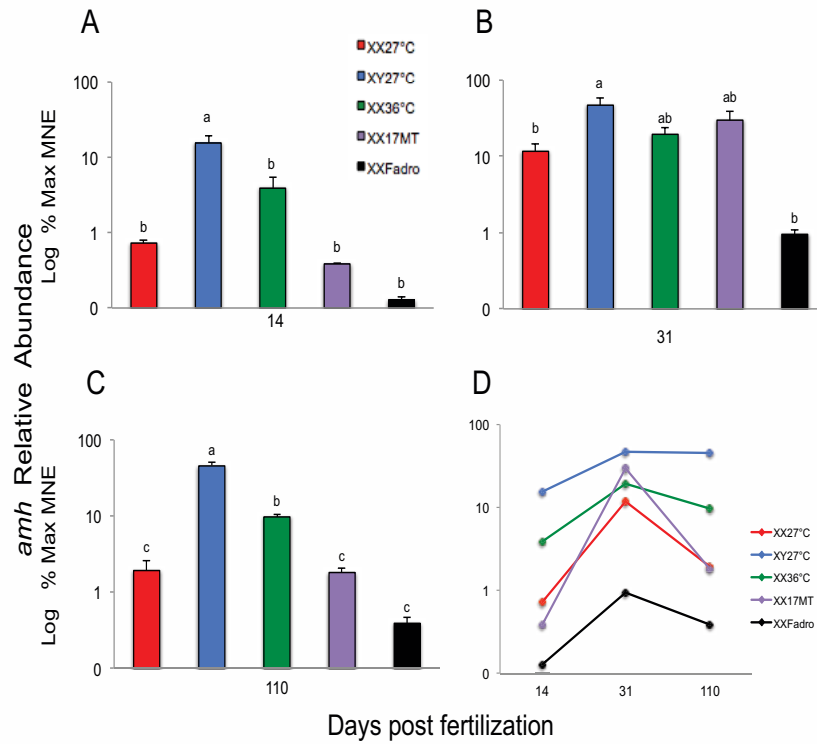
The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was analysed using two way ANOVA and mean differences were found using same time Tukey post-hoc test using XLSTAT software. Differences were considered as statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## Acknowledgements

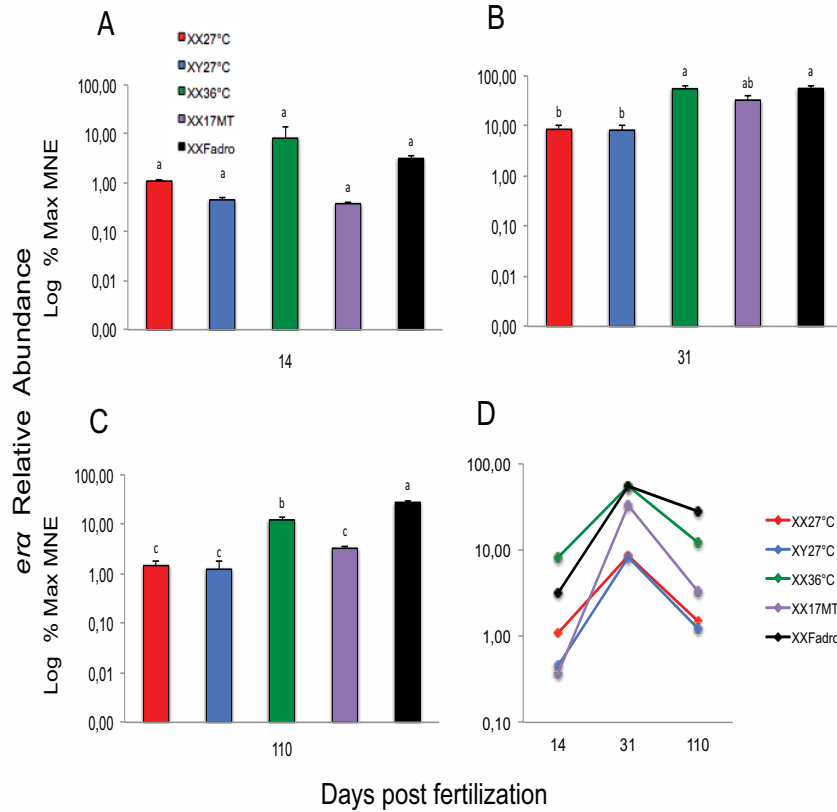
Christian Ouedraogo benefited from a grant from the French Ministry of Foreign Affairs for his PhD research in France.



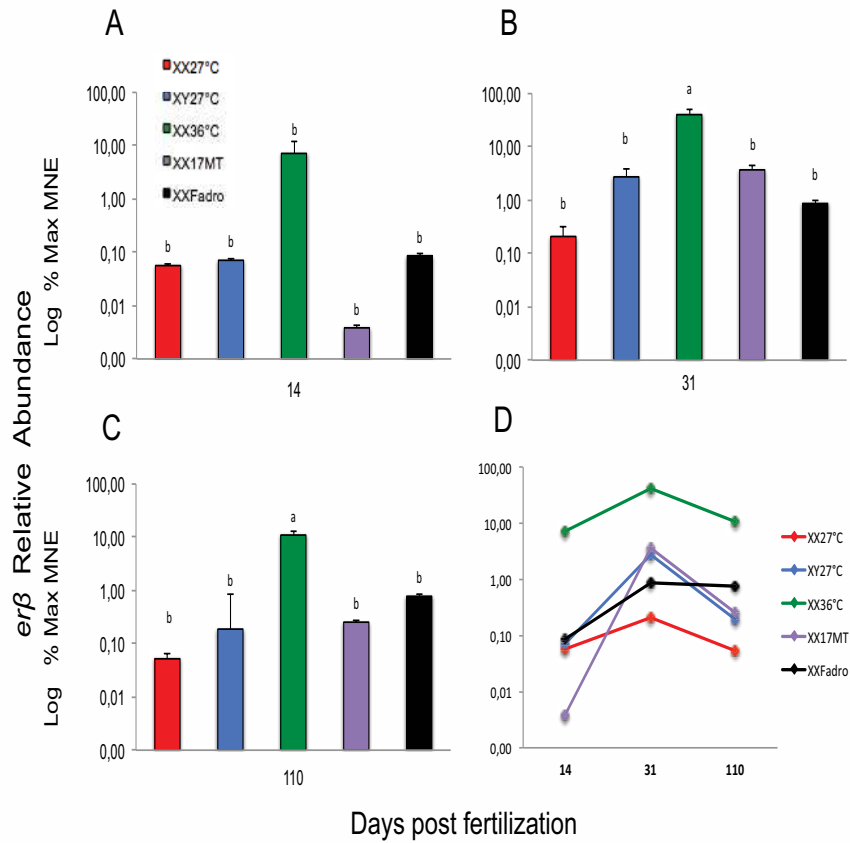
**Figure 1.** Relative abundance of *cyp19a1b* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in heads (n=30 heads). **B** Quantification at 31 dpf analysed in brains (n=8 brains). **C** Quantification at 110 dpf analysed in brain (n=8 brains). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at  $P < 0.05$  (Tukey post hoc tests).



**Figure 2.** Relative abundance of *amh* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in heads (n=30 heads). **B** Quantification at 31 dpf analysed in brains (n=8 brains). **C** Quantification at 110 dpf analysed in brain (n=8 brains). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at  $P < 0.05$  (Tukey post hoc tests).



**Figure 3.** Relative abundance of *era* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in heads (n=30 heads). **B** Quantification at 31 dpf analysed in brains (n=8 brains). **C** Quantification at 110 dpf analysed in brain (n=8 brains). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at  $P < 0.05$  (Tukey post hoc tests).



**Figure 4.** Relative abundance of *erβ* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in heads (n=30 heads). **B** Quantification at 31 dpf analysed in brains (n=8 brains). **C** Quantification at 110 dpf analysed in brain (n=8 brains). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at  $P < 0.05$  (Tukey post hoc tests).

Different masculinising treatments of XX tilapia all induce the increase of *dmrt1* and *amh* to suppress the ovarian pathway

Chapitre  
5

Ouedraogo C.  
Canonne M.  
Pepey E.  
Baroiller J.F.  
D'Cotta H.



General and Comparative Endocrinology, soumis

## Abstract

The present study was performed to analyse simultaneously the effects of different masculinizing treatments consisting on 17 $\alpha$ -methyltestosterone (17MT), 36°C temperature-induced masculinization and fadrozole-induced aromatase inhibition of XX females of tilapia to see how they modulated some key genes implicated in gonad sex-differentiation. Expression of male (*dmrt1* and *amh*) and female pathway (*foxl2* and *cyp19a1a*) genes were analysed during sex differentiation and at later stages of the life of these fish, and compared to levels obtained in genetic XY males and XX females. The gene expressions in masculinized XX fish of *dmrt1* and *amh*, revealed first that the male pathway starts to be activated very rapidly in the 36°C temperature-induced fish (at 14 dpf), just four days after the beginning of the treatment. Hence, temperature appears to be a more rapid trigger of testis development than either 17MT or fadrozole XX females. In genetic males *dmrt1* becomes up-regulated at 14 dpf followed by *amh* increase whereas, in masculinized fish both *amh* and *dmrt1* appear to work in a combined, synergistic fashion and their expression becomes in premature juvenile several fold higher than genetic males. Stimulation of the male pathway preceded the inhibition of *foxl2* and *cyp19a1a* expression in both temperature and fadrozole induced males. In contrast, no decrease was noticeably in the 17MT induced males suggesting a different masculinizing modulation which might be through androgen receptors.

## 1. Introduction

The Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is an important aquaculture species where production of all-male offspring is searched for. Sex needs to be controlled to overcome on the one hand, the premature and continuous reproduction of females which rapidly causes crowding and reduced growth, and on the other hand to benefit from the better growth rate of males (Baroiller et al., 2009). Genetic approaches to generate all-male progenies remain unreliable because sex in tilapia is governed by several factors. The Nile tilapia has a genetic sex determination of an XX/XY system similar to mammals but parental genetic factors can influence sex (Baroiller & D'Cotta, 2001; Baroiller et al., 2009). In addition, sex can be triggered by elevated temperatures and thus, all-female XX progenies can be sex-reversed into functional XX males during a critical period of gonad differentiation (Baroiller et al., 1995; 2009; D'Cotta et al., 2001).

Currently all-male offspring of tilapia are mostly produced by hormonal treatments (Guerrero and Guerrero 1988; Mélard, 1995). Fish in general are very sensitive to sex steroids during development and their sex can be inversed easily and efficiently during gonad differentiation by androgen treatments (Hunter and Donalson, 1983; Beardmore et al., 2001). The most potent androgen for tilapia sex-inversion is the synthetic steroid 17 $\alpha$ -methyltestosterone (17MT). It is presumed but not yet studied that the mode of action of 17MT in tilapia is somewhat similar to that of temperature-induced masculinization. Temperature-masulinization could be a non-hormonal and friendlier procedure to generate all-male offsprings for farming. Estrogens but not androgens have long been known to be inducers of ovarian differentiation in teleosts (Devlin & Nagahama, 2002; Guiguen et al., 1999; Guiguen et al., 2010). In tilapia, differentiating ovaries have elevated aromatase activity (Guiguen et al., 1999) and high estradiol levels (D'Cotta et al., 2001). Estrogen treatment on undifferentiated fry cause male to female sex inversion (Kitano et al., 1999; Devlin and Nagahama, 2002; Kobayashi et al., 2003). Sex-inversion of XX females can also be achieved by decreasing the biosynthesis of endogenous estrogens through the inhibition of aromatase, the catalyzer of the androgens conversion into estrogens (Guiguen et al., 1999; Kwon et al., 2000).

The masculinizing effects of androgens and high temperature are most likely due to the suppression of estrogen biosynthesis via the inhibition of the aromatase gene (*cyp19a1a*) expression. Indeed, *cyp19a1a* plays a key role in ovarian development in fish including the Nile tilapia, being highly expressed in genetic XX females and not or reduced in genetic males (Guiguen et al., 1999, 2010; Kitano et al., 1999; D'Cotta et al., 2001; Kwon et al., 2001; Ijiri et al., 2008; Shanthanagouda et al., 2012; Poonlaphdecha et al., 2013). *Cyp19a1a* expression is suppressed with temperature-induced masculinization of XX females in tilapia (D'Cotta et al., 2001; Poonlaphdecha et al., 2013) as well as in the Japanese flounder (Kitano et al., 2000). In the Japanese flounder, masculinization of XX females through high water temperature (27°C), 17MT or using the aromatase inhibitor fadrozole all caused suppression of *cyp19a1a* mRNA expression in the gonads, and 17 $\beta$ -estradiol could reverse the effects (Kitano et al., 2000; Kitano et al., 2007).

During the onset of ovarian differentiation, the expression of the winged helix/forkhead transcription factor *foxl2* gene is up-regulated in several teleosts such as in rainbow trout (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2008) the Japanese flounder (Yamaguchi et al., 2007) and the Nile tilapia (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013). *FoxL2* was found to be a regulator of the *cyp19a1a* promoter in the Japanese flounder (Yamaguchi et al., 2007) and the Nile tilapia (Wang et al., 2007) and enhanced the mediated nr5a1 (*sfl*) transcription of



*cyp19a1a* (Wang et al., 2007). The temporal expression patterns of *foxl2* and *cyp19a1a* in 17MT and temperature-induced masculinizations have not yet been studied in the Nile tilapia.

Testis differentiation is characterized in teleosts by an early up-regulation of the Doublesex and Mab-3 (DM)-related transcription factor1 (*dmrt1*) expressed in Sertoli cells (Guan et al., 2000; Marchand et al., 2000; Kobayashi et al., 2004). The sex-determining gene DMY on the Y chromosome in medaka was generated by a duplication of the autosomal *dmrt1* gene (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). In tilapia *dmrt1* dimorphic expression is already evident in XY males at 9 to 10 dpf, a stage when the gonads are still undifferentiated and was inversely correlated with *cyp19a1a* (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013). *Dmrt1* is rapidly up-regulated in temperature-induced masculinization of tilapia only 4 days after initiation of the treatment (Poonlaphdecha et al., 2013). Interestingly, *dmrt1* was not expressed in the Nile tilapia XY treated with estradiol (E2) whereas it was expressed in the XX males (Kobayashi et al., 2003). In the pejerrey, *dmrt1* was dimorphic at male promoting temperatures (MPT) and was repressed in E2 treated fish (Fernandino et al., 2008a). However, in zebrafish *dmrt1* expression is not sexually-dimorphic (Guo et al., 2005). *In vitro* studies showed that *dmrt1* is a repressor of the *cyp19a1a* gene in the Nile tilapia (Wang et al., 2010) and *in vivo* is suggested to modulate both *cyp19a1a* and *foxl2* (Poonlaphdecha et al., 2013).

The testis increase of the *dmrt1* gene expression is followed by the up-regulation of the anti-müllerian hormone *amh* gene expression in tilapia (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013). In teleosts, the role of *amh* is other than the regression of the Müllerian ducts since these are absent. *Amh* plays nevertheless an important role in the testis differentiation of teleosts since it has been shown to have a sexually-dimorphic expression in species such as in the Japanese flounder (Yoshinaga et al., 2004), the rainbow trout (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2008) and the Nile tilapia (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2011; 2013). In the pejerrey, *amhy* has become the sex-master gene located on the Y chromosome through the duplication of the autosomal *amh* gene (Hattori et al., 2012). In 2008, Fernandino et al., showed in the pejerrey that one of these *amh* was highly expressed at MPT. *Amh* is strongly expressed also in temperature-induced males in the Japanese flounder (Kitano et al., 2007) and the Nile tilapia (Poonlaphdecha et al., 2013). In the Japanese flounder Yoshinaga et al. (2004) showed that *amh* transcript expression was strongly observed in the gonads of XX sex-reversed males reared at 27°C or treated with 11-ketotestosterone, whereas it was hardly detected in the gonads of the XX females reared at 18°C. Likewise high transcript levels of *cyp19a1a* were observed in the pejerrey gonads at female-promoting temperatures (FPT) whilst low levels were found in the testes at male-promoting temperatures (MPT)

(Fernandino et al., 2008a), resulting in decreased *cyp19a1a* expression and increased titres of 11-ketotestosterone and testosterone (Hattori et al., 2009). In the pejerrey and the Japanese flounder *amh* is modulated by estrogens (Fernandino et al., 2008b; Kitano et al., 2007).

Together, studies suggest that for testis differentiation it is necessary to increase *dmrt1* and *amh* and suppress the estrogen pathway of ovaries. The molecular pathway for temperature-induced masculinization in tilapia was seen to differ from the normal or genetic testis differentiation since both *dmrt1* and *amh* were simultaneously up-regulated (Poonlaphdecha et al., 2013). The present study was performed to analyse simultaneously the effects of different masculinizing treatments consisting on 17MT, temperature-induced masculinization and fadrozole-induced aromatase inhibition of tilapia and compare them to genetic XY males and XX females. Key genes of the male (*dmrt1* and *amh*) and female pathway (*foxl2* and *cyp19a1a*) were analysed during sex differentiation and at later stages of the life of these fish.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and samplings*

All-females XX progenies were produced by fertilising a pool of eggs from several XX synchronised females with a pool of sperms from several XX males. In addition, an all genetic XY male progeny (XY-27°C) were produced by fertilising part of the same pool of eggs with a pool of sperm from several YY males. Pools were used in order to limit family effects. After artificial fertilisation the eggs were incubated at 27°C, kept at a constant photoperiod (12:12) and fed *ad libitum* from 10 days post fertilisation (dpf) onwards. The all-female XX individuals were divided into four groups: a control reared at 27°C (XX-27°C), a group treated to 36°C temperature (XX-36°C), a FAD group treated at 500 mg/kg of feed (XX-Fadro), and a 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT) treated at 60mg/kg of feed. Fadrozole and the MT were first dissolved in 99% ethanol and this was then added to the feed. After evaporation the feed was conserved at 4°C. A fifth group consisting in all-male XY fish reared at 27°C served as a male control. The treatments started at 10 dpf and lasted 30 days. Following euthanasia by high doses of Eugenol, trunks were sampled at 14dpf, and then individual gonads were excised at 31dpf and at 110dpf under a stereo microscope dissecting both gonads and fish trunks in which the viscera were removed. At 14dpf the trunks were

pooled, 3 trunks per pool, from a sample of 30 trunks per treatment. At 31dpf and 110dpf, individual gonads were used in a total of 8 individuals per treatment. About 100 individuals per group were kept and sexed after 3 months to verify the progenies sex ratios and the efficiency of the treatments. Sexing was performed by macroscopic observation of the gonads and several additional sex squashes.

## *2.2. Total RNA extraction, DNase treatment and reverse transcription*

Total RNA was extracted from the individual heads or brains using the TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The pooled trunks and the gonads were homogenised with IKA-T10 Ultra-Turrax (Germany). Total RNA obtained from the tissues were resuspended in 20µl (14dpf), 30µl (31dpf) and 40µl (110 dpf) of RNase-free water. Quantification of the RNA was assessed by Nanodrop and RNA integrity was evaluated on a 1% agarose gel. Two µg total RNA from the pooled trunks and 3 µg for the gonads were then incubated at 37°C for 30 minutes with 0.5 TURBO DNase (Ambion, Austin, Texas, USA) to remove possible genomic DNA. EDTA was then added to a final concentration of 5mM, and the DNase was inactivated by heating at 75°C for 10 minutes. First strand cDNA was reversed transcribed with oligo (dT)<sub>12-18</sub> primers, RNaseOUT using the SuperScript<sup>TM</sup> II (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) carried out at 42°C for 60 minutes and then inactivated by heating at 70°C for 15 minutes.

## *2.3. Quantitative real-time PCR analysis*

Real-time PCR was performed using a Stratagene MX3000P qPCR system (Stratagene, La Jolla, CA). The five primer sequences were published in Poonlaphdecha et al., 2013. All primers had a T<sub>m</sub> of 60°C apart from *foxl2* that had 62°C. *Efl* was used as a reference gene for standardization of expression levels. PCR reactions were performed in 10µl with 300nM of each primer using the Brilliant II SYBR-Green qPCR Master Mix (Agilent technologies, France). Reactions were carried out using 40ng cDNA per well and run in duplicates for each sample at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 30 s, 60°C or 64°C for 30 s and 72°C for 30 s, and with a dissociation at 95°C for 1 min, 55°C for 30 s and 95°C for 30 s. For each qPCR reaction none

template control (NTC) were systematically amplified. Primer specificity was verified by a final dissociation curve in which a single peak was obtained. The cycle threshold ( $C_t$ ) was calculated for the average of two duplicates analysis performed for each sample. The amplification efficiency (E) was calculated from gene-specific standard curves performed on a serially diluted PCR product and calculated according to the equation  $E=10^{(-1/\text{slope})}$ . Expression amounts were calculated from a modified  $\Delta C_t$  method which takes into consideration different PCR efficiencies, expressed as Mean Normalisation Expression (MNE) calculated according to the equation  $MNE_{\text{target}} = (E_{\text{reference}})^{C_t \text{ reference}} / (E_{\text{target}})^{C_t \text{ target}}$ . Relative expression amounts were then expressed as the percentage Maximum MNE value ( $=MNE_{\text{target}} \times 100 / MNE_{\text{maximum}}$ ).

#### 2.4. Data analysis

The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was analysed using two way ANOVA and mean differences were found using same time Tukey post-hoc test using XLSTAT software. Differences were considered as statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

The treatments were efficient in all cases. The genetic XY males gave a sex-ratio of 100% males while the XX females were all females (0% males). The XX progeny treated to fadrozole (XX-Fadro) and  $17\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT) gave sex-ratios of 100% males whereas the 36°C temperature-treated XX fish (XX-36°C) had a sex-ratio of 90.3% males.

The gene expressions were analyzed at three different stages throughout the lifehood of tilapia: 14, 31 and 110 dpf. The first period was at 14 dpf four days after the beginning of the various masculinizing treatments, which corresponds to a stage when the gonad are still undifferentiated and considered bipotential, but when they are labile to external factors notably temperature and exogenous sex steroid treatments (Baroiller et al., 1995; 2009a; Devlin and Nagahama, 2002). The second period analyzed was at 31 dpf, 10 days before the end of the masculinizing treatments. At 31 dpf the ovarian meiosis has already started and

germ cell proliferation has began in the future testis, (D'Cotta et al., 2001; Ijiri et al., 2008). In the last period analyzed the fish are sexually matured and able to reproduce.

### 3.1. Analysis of the transcription factor *foxl2*

At 14 dpf, XX females had comparable *foxl2* transcript levels to XY-27°C ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1A). These levels were significantly different from both the XX-17MT and the XX-Fadro induced males ( $P < 0.05$ ). The highest *foxl2* expressions were found in the XX-36°C males ( $P < 0.05$ ). At 31dpf onwards, *foxl2* transcripts levels increased considerably (Fig. 1B) in the XX-27°C fish remaining the highest thereafter (3.5566 fold,  $P < 0.05$ ). Levels in the XX-17MT were the second highest ( $P < 0.05$ ) and were significantly different from the XX-36°C. These last showed higher levels ( $P < 0.05$ ) than both the XX-Fadro and genetic males XY-27°C which had somewhat similar values. Surprisingly at 110dpf the XX-17MT had similarly elevated levels to those of the genetic females XX-27°C (Fig. 1C), whilst XX-Fadro and XX-36°C males had similar expression levels. The lowest *foxl2* transcript levels of were observed in the genetic males XY-27°C Overall, females showed a steady and large increase in *foxl2* expressions from 31 dpf onwards followed by the XX-17MT (Fig. 1D).

### 3.2. Expression profiles of the steroidogenic aromatase gene *cyp19a1a*

*Cyp19a1a* expression at 14dpf was higher in genetic females XX-27°C compared to males XY-27°C (Fig. 2A). Females had similar levels to both the XX-17MT and the XX-Fadro groups whilst the XX-36°C had significantly higher *cyp19a1a* levels ( $P < 0.05$ ). At 31dpf onwards there was a significant increase ( $P < 0.05$ ) of *cyp19a1a* mRNA expressions in females XX-27°C the XX-36°C and the XX-Fadro males (Fig. 2B), . The XX-17MT had intermediate levels while the genetic males XY-27°C had the lowest *cyp19a1a* expressions. In the premature fish at 110 dpf, the *cyp19a1a* transcript levels remained lowest in the gonads of the genetic males XY-27°C which was significantly different ( $P < 0.05$ ) from the XX-36°C and the XX-Fadro fish (Fig. 2C). Although the *cyp19a1a* transcript remained highest for the females, they were similar to the XX-17MT amounts, which had increased considerably at 31 dpf to 110 dpf (Fig. 2D). Throughout the 3 stages, the genetics males had the lowest transcript of *cyp19a1a*.

### 3.3. Expression of the *amh* gene

At 14dpf the XX-36°C group had a significantly high *amh* expression while all the other 4 groups had comparable levels (Fig. 3A). After this stage *amh* expression became the highest in the XX-Fadro fish at 31 dpf (Fig. 3B) and was significantly different ( $P < 0.05$ ) from both the XX-17MT and the XX-36°C. *Amh* expression remained lower for both the XX-27°C and the XY-27°C groups. At 110dpf, the genetic females had the lowest *amh* transcript ( $P < 0.05$ ), followed by the genetic males XY-27°C (Fig. 3C) with significantly higher levels found in the XX-36°C induced males. Both the XX-17MT and XX-Fadro males had very high *amh* levels. All the masculinising treatments showed a marked increase in their *amh* expression after 31 dpf with the XX-17MT reaching the highest levels in premature males ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3D).

### 3.4. Expression of the transcription factor *dmrt1* gene

The transcript level of *dmrt1* at 14dpf (Fig. 4A) resembled the *amh* expression profiles, with significantly higher *dmrt1* levels observed in the XX-36°C fish. In the gonads at 31dpf *dmrt1* became highest in genetic males XY-27°C whilst the XX-36°C, XX-Fad and XX-17MT had comparable levels with the lowest level found in the genetic females (Fig. 4B). In the premature juveniles gonads, the *dmrt1* gene expression remained lowest in the genetic females ( $P < 0.05$ ) but levels in the three masculinized XX fish were all elevated, reaching even higher levels than those of the genetic males. (Fig. 4C). *Dmrt1* transcript levels rose in all the males throughout juvenile development particularly the phenotypic XX males (Fig. 4D).

## 4. Discussion

The present study was undertaken to see if different masculinizing treatments applied to XX females of Nile tilapia modulated in a similar manner some key genes implicated in gonad sex-differentiation. The gene expressions in masculinized XX fish of *dmrt1* and *amh*, two genes of testis differentiation, revealed first that the male pathway starts to be activated

very rapidly in the 36°C temperature-induced fish, just four days after the beginning of the treatment. Secondly, the activation of the male pathway took longer in the XX females treated with 17 $\alpha$ -methyltestosterone and treated with fadrozole, the inhibitor of aromatase activity. Our finding showing a rapid increase of both *dmrt1* and *amh* in the temperature-induced males at 14 dpf is consistent with our previous results (Poonlaphdecha et al., 2013). The gonad at this stage is still undifferentiated and we consider it the critical period when the fate of the gonad can be modified by external factors (Ijiri et al., 2008; Baroiller et al., 2009). Our study suggests that temperature is a more rapid trigger of testis development than the other masculinizing treatments.

*Dmrt1* is the first gene to be up-regulated during testis differentiation, becoming dimorphic in genetic XY males at 10 dpf (Ijiri et al., 2008) or slightly later 13-14 dpf (Poonlaphdecha et al., 2013). In the present study *dmrt1* expression was not yet sexually dimorphic at 14 dpf in genetic fish and this was only evident at the second sampling stage of 31 dpf when *dmrt1* levels had increased more than 400 fold. The difference in timing of *dmrt1* dimorphic expression might stem from the analysis having been conducted here in trunks rather than gonads which are not as sensitive (Poonlaphdecha et al., 2013). *Dmrt1* levels continued to increase in the premature juvenile fish not only in the genetic XY males but also in the masculinized females probably due to the increase in Sertoli cells. Astonishingly, *dmrt1* levels in the different masculinized XX fish were much higher than in the genetic males. This profile was also apparent for *amh* expression, observed already at 31 dpf and becoming much more pronounced in premature fish. *Amh* was also up-regulated just 4 days after initiation of the temperature treatment of XX females. In previous studies *amh* was up-regulated after *dmrt1* in genetic XY tilapia suggesting that *amh* is a down-stream gene (Ijiri et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013). This pattern differs in our phenotypic males since both *amh* and *dmrt1* appear to work in a combined, synergistic fashion in the masculinizing treated fish.

Fadrozole induced 100% female to male sex inversion in the present study. The fadrozole inhibition of aromatase presumably decreased the endogenous estrogen synthesis. Estrogens are thought to be suppressors of *amh* in the gonads of teleost. Estrogen depletion may have caused the strong *amh* up-regulation seen in the fadrozole fish at 31 dpf in the present work. 17 $\beta$ -estradiol supplementation counteracted the masculinizing effects of high temperatures in both the Japanese flounder and pejerrey, causing a decrease in *amh* expression and an increase of *cyp19a1a* expression (Kitano et al., 2007; Fernandino et al., 2008a). An inverse correlation between *amh* and *cyp19a1a* was observed in the pejerrey (Fernandino et al., 2008), in rainbow trout (Vizziano et al., 2008) but not really evident in genetic XY tilapia compared to XX females since *dmrt1* was expressed earlier than *amh* (Ijiri et al., 2008;



Poonlaphdecha et al., 2013). An inverse correlation was clearly not evident in the temperature-induced masculinized tilapia (Poonlaphdecha et al., 2013) or in the present study, with *amh* apparently being more a target of aromatase or estrogens than an inhibitor of aromatase such as in fetal mammals (Vigier et al., 1989).

Previous *in vivo* studies reported that *dmrt1* suppresses the female pathway (Kobayashi et al., 2008; Poonlaphdecha et al., 2013), with transactivation studies showing that it also suppresses the *cyp19a1a* transcription by binding to its promoter (Wang et al., 2010). *Cyp19a1a* gene expression and aromatase activity are essential for ovarian differentiation in fish including tilapia (D'Cotta et al., 2001; Piferrer and Guiguen, 2008; Guiguen et al., 2010). The masculinization through temperature treatment in tilapia suppresses the *cyp19a1a* expression (D'Cotta et al., 2001; Poonlaphdecha et al., 2013). Temperature masculinization also caused the down-regulation of *cyp19a1a* in the Japanese flounder (Kitano et al., 1999) and the pejerrey (Fernandino et al., 2008a). In the present study temperature at 14 dpf and even at 31 dpf had not yet suppressed *cyp19a1a*. In fact both temperature-induced males and fadrozole-induced males showed higher levels of *cyp19a1a* at 31 dpf than genetic males, while in pre-maturing juveniles *cyp19a1a* expression in the 17MT males was essentially equivalent to females. In contrast genetic males showed always a dimorphically low *cyp19a1a* expression.

In the present study *cyp19a1a* was sexually dimorphic at 14 dpf between genetic females and genetic XY males while *foxl2* expression remained the same, but from then onwards *foxl2* profile resembled that of *cyp19a1a*. *Foxl2* belongs to the forkhead family and is another transcription factor shown to be involved in the regulation of *cyp19a1a* expression (Govoroun et al., 2004; Shoemaker and Crews, 2009). *Foxl2* binds to the promoter region of *cyp19a1a* through its forkhead domain and activates the transcription of the gene (Wang et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007). Moreover, a positive regulatory loop between *foxl2* on *cyp19a1a* has been suggested in view of the regulation of *foxl2* on *cyp19a1a*, supported by the up-regulation of *foxl2* by estrogens in fish (Guiguen et al., 2010). A correlated spatial and temporal expression of transcript of *foxl2* with that of *cyp19a1a* were reported in early ovarian development of the Nile tilapia by Ijiri et al. (2008) but not by Poonlaphdecha et al., (2013). A similar spatio-temporal correlation between *foxl2* and *cyp19a1a* expressions have been shown in several species such as the rainbow trout (Vizziano et al., 2008), chicken (Govoroun et al., 2004) and the TSD snapping turtle (Rhen et al., 2007). In this study, although decrease in *foxl2* was noted for both the temperature-induced males and fadrozole-induced males at 31 dpf, *cyp19a1a* had comparable expression to those of females. Interestingly in the 17MT *foxl2* levels at 31 dpf were higher than the other masculinized fish

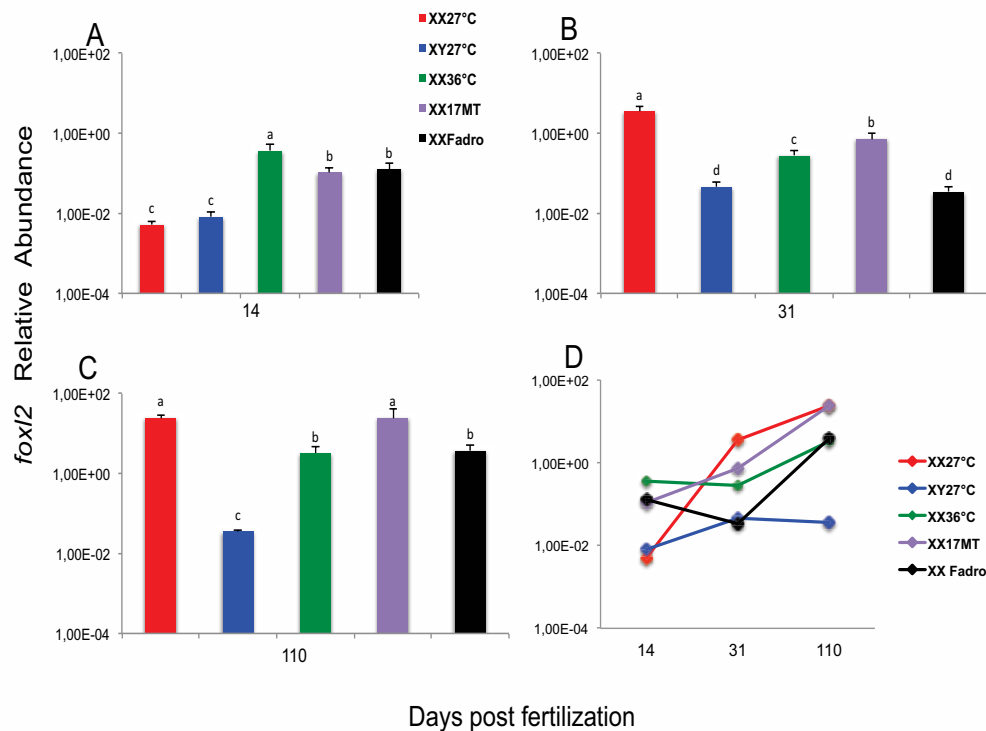
and in prematuring fish both *foxl2* and *cyp19a1a* expressions were similar to XX females. The follicle stimulating hormone *fsh* and its receptor play an important role in ovarian differentiation regulating *cyp19a1a* via cAMP promoter activation (Yamaguchi et al., 2007). How they regulate the masculinization of XX in tilapia has yet to be studied.

In a 17MT treatment of XX tilapia Bhandari et al. (2006) showed a suppression of all the steroidogenic enzymes including cytochrome P450 cholesterol-side-chain-cleavage (P450<sub>scc</sub>) which is in contrast to what has been found in the rainbow trout (Govoroun et al., 2001). One of the masculinizing actions of androgens (Kitano et al., 2000) as well as temperature is the down-regulation of the female *cyp19a1a* expression (Kitano et al., 1999; D'Cotta et al., 2001a; Poonlaphdecha et al., 2013). Another action in tilapia of temperature-induced masculinization is the stimulation of the *11b-hydroxylase* gene expression around 18 dpf (D'Cotta et al., 2001b). In the present study, the 17MT induced masculinization induced a suppression of *cyp19a1a* evident at 31 dpf but surprisingly, in prematuring juveniles *cyp19a1a* levels increased in the testis of 17MT fish and reached comparable levels to those found in ovaries XX females. It is possible that 17MT could be aromatized into 17- $\alpha$ -methylestradiol which is a functional estrogen (de Gooyer et al., 2003; Hornung et al., 2004). A recent study in tilapia using 17MT and DHT, this last a non-aromatizable androgen but much less potent in inducing sex-inversions, gave similar inhibitory patterns (Golan & Levavi-Sivan, 2014). The blocking of both 17MT and DHT with flutamide caused a decrease in their sex-inversion efficiencies and suggested that their androgenic action is through the androgen receptors rather than by inhibiting aromatase activity (Golan & Levavi-Sivan, 2014). This last study found that fadrozole treatment of tilapia caused the inhibition of the aromatase activity but with flutamide, there was a decrease in the efficiency of female to male inversion indicating that possible unprocessed testosterone also plays a role in the fadrozole masculinizing action.

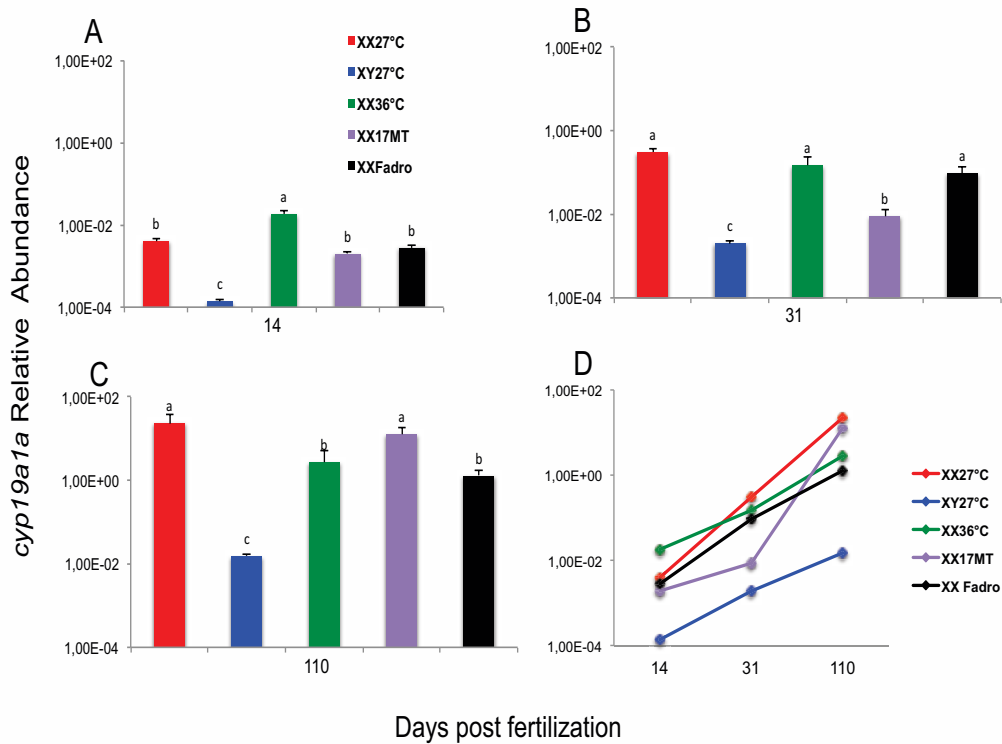
Our study suggests that temperature and fadrozole masculinizations show similar decrease in *foxl2* and *cyp19a1a* expressions and therefore, part of their masculinizing action is most likely through the inhibition of aromatase gene/activity causing the depletion of endogenous estrogens. In contrast, the 17MT masculinizing action does not appear to need the decrease of neither *foxl2* nor *cyp19a1a* suggesting another regulation to avoid the ovarian pathway, which probably involves androgen receptors. Previous studies showed that temperature-masculinization advanced the time of expression of many genes that are normally expressed later during testis development of genetic XY males, such as *11b-hydroxylase* (D'Cotta et al., 2001b), *sox9s* (Baroiller et al., 2009), *amh* (Poonlaphdecha et al., 2013) and *dax1* (D'Cotta et al., unpublished data). The present study correlate these findings indicating that in the tilapia

masculinization of XX females with high temperature, 17MT or fadrozole there is a very rapid activation of testis differentiating genes probably to ensure the male pathway, which then suppresses the female pathway. This differs from what has been described in androgen treatments of XX rainbow trout where genes of the ovarian pathway are first stimulated and then some genes of the testis differentiation, but not all, are down-regulated (Baron et al., 2007). It is possible that in tilapia, the temperature masculinization is regulated via methylation of the *cyp19a1a* promoter, which has been recently been shown in seabass (Navarro et al., 2011). Epigenetic regulation of key genes may indeed play an important role tilapia masculinization.

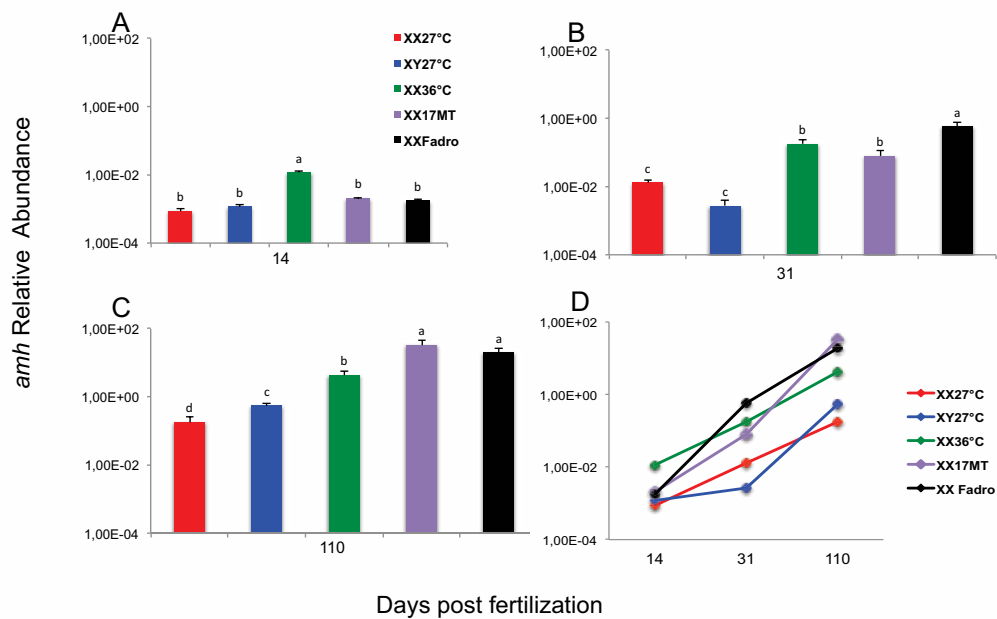
In conclusion we have shown that temperature, fadrozole and 17 $\alpha$ -methyltestosterone applied to undifferentiated XX Nile tilapia larvae induced an enhanced up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions, and the elevated levels persisted until juveniles were premature. Temperature triggered this male pathway much earlier than the other masculinizing treatments, at only 4 days after the beginning of the treatment. This stimulation of the male pathway was followed by a down-regulation of both *foxl2* and *cyp19a1a* in the temperature and the fadrozole treated groups, which presumably depleted estrogen levels suppressing ovarian differentiation. In contrast, masculinization with 17 $\alpha$ -methyltestosterone did not suppress *cyp19a1a* or *foxl2* suggesting that the androgen action might be mediated via the androgen receptors. How these differences are reflected in adulthood other than in the modulation of the gene expressions would be of interest, in order to see if reproductive physiology or behaviour is altered.



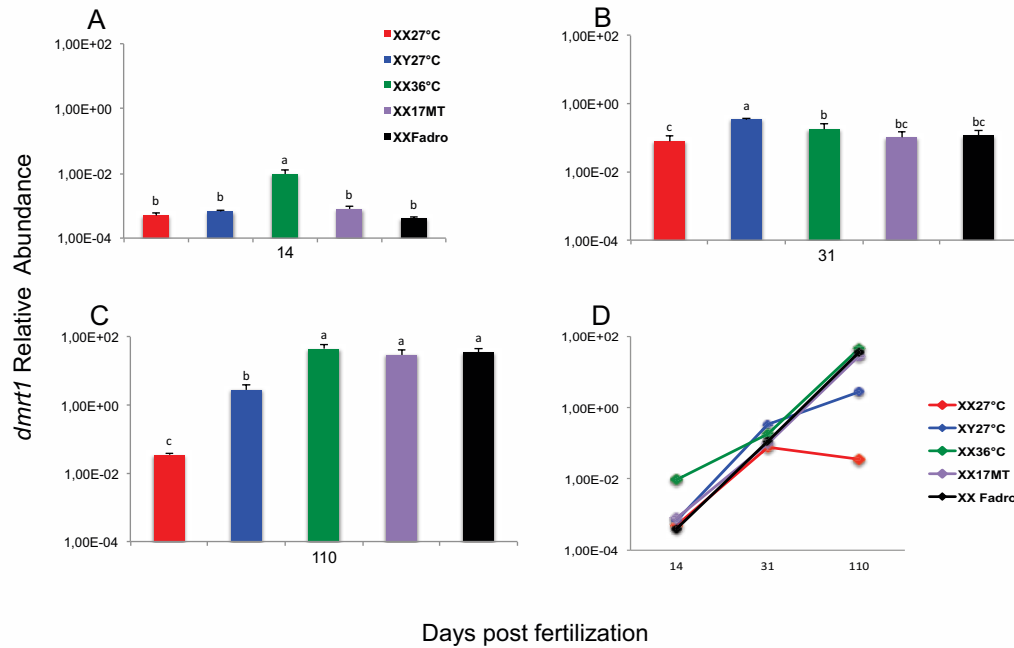
**Figure 1.** Relative abundance of *foxl2* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in pooled trunks (n=10 pools of 3 trunks). **B** Quantification at 31 dpf analysed in individual gonads (n=8). **C** Quantification at 110 dpf analysed in individual gonads (n=8). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at P<0.05 (Tukey post hoc tests).



**Figure 2.** Relative abundance of *cyp19a1a* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in pooled trunks (n=10 pools of 3 trunks). **B** Quantification at 31 dpf analysed in individual gonads (n=8). **C** Quantification at 110 dpf analysed in individual gonads (n=8). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at P<0.05 (Tukey post hoc tests).



**Figure 3.** Relative abundance of *amh* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in pooled trunks (n=10 pools of 3 trunks). **B** Quantification at 31 dpf analysed in individual gonads (n=8). **C** Quantification at 110 dpf analysed in individual gonads (n=8). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at  $P < 0.05$  (Tukey post hoc tests).



**Figure 4.** Relative abundance of *dmrt1* gene expression given as % maximum Mean Normalisation Expression (MNE) in genetic females (XX-27°C, red) and males (XY-27°C, blue) compared to individuals sex-reversed with 36°C temperature (XX-36°C, green), 17 $\alpha$ -methyltestosterone (XX-17MT, purple) and fadrozole (XX-Fadro, black). **A** Quantification at 14 days post fertilization (dpf) analysed in pooled trunks (n=10 pools of 3 trunks). **B** Quantification at 31 dpf analysed in individual gonads (n=8). **C** Quantification at 110 dpf analysed in individual gonads (n=8). **D** Age-dependent variation of MNE. Values are means $\pm$ SEM, where a same superscript shows no significant difference at P<0.05 (Tukey post hoc tests).

## Acknowledgements

Christian Ouedraogo benefited from a grant from the French Ministry of Foreign Affairs for his PhD research in France.



## Discussion Générale et Perspectives



## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette thèse était double : 1) sur un plan zootechnique, l'étude visait à déterminer le traitement masculinisant qui induisait des performances similaires voire supérieures à celles des mâles génétiques. 2) A un niveau plus fondamental, l'étude se proposait de faire une analyse comparative des effets physiologiques et moléculaires à court et moyen termes de trois traitements masculinisant (fandrozole, 17MT et température élevée), au niveau du système nerveux central ou des gonades de mâles XX induits, par rapport à des femelles et des mâles génétiques.

La comparaison des différents types de néo-mâles (thermo-néomâles, fandro-néomâles, 17MT-néomâles) avec des mâles et femelles génétiques en conditions de compétition nous a d'abord conduit à développer deux approches:

- la synchronisation des géniteurs femelles de tilapia du Nil de manière à obtenir un pool homogène d'œufs et de se prémunir de problèmes inhérents à la variabilité génétique familiale
- le marquage précoce des juvéniles sans effet négatif sur la survie et la croissance.

Nous avons ensuite cherché à répondre à deux questions :

- quel type de traitement masculinisant produit-il des mâles aux performances de croissance les plus proches possibles de celles des mâles génétiques ?
- quels sont les déterminants physiologiques et moléculaires qui sous-tendent le dimorphisme sexuel de croissance en faveur des mâles ?

Nos travaux apportent les réponses suivantes à ces questions :

### **1. De la production des descendance et du suivi des performances de croissance des mâles induits**

Cette première étude (Chapitres 1, 2 et 3) nous a d'abord permis de synchroniser les pontes de nos géniteurs femelles, et de disposer ainsi d'un même pool d'œufs fécondables par deux pools de sperme (issus de mâles XX et YY) et de limiter ainsi l'impact de la variabilité

familiale (Baroiller et al., 1995a, 2009a; Wessels & Hörtsgen-Schwarck, 2007). Nos essais de synchronisation des pontes de femelles tilapias s'inscrivent dans la lignée de travaux antérieurs visant à favoriser la mise en place de plans de croisement impliquant différents génotypes pour des recherches aquacoles (Wohlfarth & Hulata, 1983 ; Biswas et al., 2005; Mylonas et al., 2010; Huertas et al., 2014; ). Ce travail nous a permis de limiter autant que possible l'impact des effets parentaux, qui constituent l'une des difficultés majeures pour l'étude du déterminisme et de la différenciation du sexe chez le tilapia du Nil (Baroiller et al., 1995a, 2009a). La démarche entreprise ici ne visait donc pas à déterminer l'importance respective des stimuli permettant d'abord d'inhiber puis ensuite de stimuler la reprise de la vitellogenèse chez les femelles de tilapia du Nil (cf. Chapitre 1), mais davantage de contrôler l'ensemble des facteurs d'ores et déjà identifiés pour synchroniser leurs pontes.

De toute évidence, l'application de l'ensemble des facteurs inhibant puis de conditions favorables à la reprise de la vitellogenèse de la vague ovocytaire suivante a été efficace, puisque les 10 femelles utilisées ont ovulé à moins de 24 heures d'intervalle (7 et 3), offrant ainsi un bon contexte de synchronisation permettant de disposer d'un pool d'ovules suffisamment conséquent pour les objectifs de cette étude.

## **2. Identification individuelle des poissons dès le plus jeune âge : nouvelles générations de marques électroniques et nouvelles opportunités**

La croissance des poissons est extrêmement contextuelle (patrimoine génétique, contexte d'élevage). Or la croissance et la taille atteintes au terme de la période de différenciation du sexe sont cruciales pour déterminer dans quelle mesure les poissons peuvent être marqués individuellement. De manière à nous prémunir d'un possible effet « souche », nous avons examiné l'adéquation de protocoles impliquant l'utilisation de marques électroniques de dernière génération, et de faibles poids et volumes, susceptibles de permettre un suivi individuel des animaux, y compris à des stades précoces. De fait, des puces électroniques standards ont pu finalement être utilisées (cf. Baras et al., 1999), compte tenue de la forte croissance des poissons étudiés.

En pratique, nos recherches (Ouedraogo et al., sous presse) sur ce domaine permettent désormais de marquer individuellement des tilapias du Nil d'un poids de 200 mg, (ou 400 mg si on veut éviter toute influence sur la croissance des poissons). Ces résultats rejoignent les conclusions de Cousin et al. (2012) sur le poisson-zèbre, espèce à faible croissance, mais offrent davantage de précisions quant à l'effet des marques et/ou de l'intervention

chirurgicale sur la survie et la croissance d'une espèce à croissance rapide, le tilapia. Ces recherches soulignent également l'importance du quotient poids de la marque / poids du poisson, y compris pour des marques de très faible poids / volume, rejoignant en cela les recommandations de Winter (1983) sur le ratio critique (2.0-2.5% du poids) pour l'utilisation des marques de biotélémétrie chez les poissons. Cette étude met également en évidence que ce quotient ne suffit cependant pas pour se prémunir de conséquences négatives du marquage sur la croissance des poissons de très petite taille, eu égard à la difficulté d'effectuer une intervention chirurgicale sans impact en deçà d'une taille minimale des poissons.

Les besoins de comparaison en condition de compétition ont soulevé trois types de questions: (1) à partir de quelle taille peut-on marquer individuellement des tilapias du Nil sans que cela n'affecte leur survie et leur croissance, (2) quel type de traitement masculinisant produit des mâles aux performances de croissance proches de celles des mâles génétiques et (3) quels mécanismes sous-tendent le dimorphisme sexuel de croissance en faveur des mâles ?

Nos travaux apportent les réponses suivantes à ces questions :

Chez le tilapia du Nil les mâles ont de meilleures croissances que les femelles, ce qui est assez rare chez les poissons. Plusieurs méthodes de production de populations monosexes mâles ont été développées afin de profiter de la meilleure croissance des mâles (Baroiller & D'Cotta, 2001 ; Beardmore et al., 2001), et de contrôler une reproduction continue chez cette espèce à maturité sexuelle précoce, pour éviter la surpopulation et le nanisme des populations d'élevage (Baroiller et al., 2009a).

Dès l'âge de 40 jpf, un dimorphisme de croissance entre les femelles (XX-29°C) et les mâles génétiques (XY-29°C), est mis en évidence, au détriment des femelles. Des études précédentes avaient relevé que le dimorphisme de croissance lié au sexe chez le tilapia du Nil pouvait se mettre en place de façon précoce, particulièrement dans des volumes d'élevage restreints (Baras & Mélard, 1997). De plus, le dimorphisme sexuel de croissance chez cette espèce est plus marqué lorsque les deux sexes sont élevés séparément (Toguyéni et al., 2002), comme c'était le cas dans notre étude jusqu'à 40 jpf (période de traitement). Les influences des conditions d'élevage et du sexe ratio sont confirmées par la présente étude, puisque durant la phase d'élevage en bassin commun plus large, la différence de croissance entre les mâles et les femelles génétiques s'est révélée nettement moins importante que pendant la période des traitements où les deux sexes étaient élevés séparément.

Pendant la période de traitement (10-40 jpf), les poissons masculinisés par la 17MT ont grossi plus vite que les mâles génétiques XY-29°C. Des résultats similaires ont été observés

dans plusieurs études qui expliquent cette meilleure croissance par les effets anabolisants des stéroïdes mâles (El-Greisy & El-Gamal, 2012 ; Mair et al., 1995) ou du fait d'une meilleure conversion alimentaire induite par les traitements (Chakraborty & Banerjee, 2010 ; Toguyéni et al., 1997). La croissance des poissons masculinisés au fadrozole était similaire à celle des poissons traités à la 17MT. Des effets positifs du fadrozole sur la croissance ont été relevés chez d'autres espèces de poissons, notamment chez la carpe commune *Cyprinus carpio* (Tzchori et al., 2004) et la perche eurasiennne *Perca fluviatilis* (Mandiki et al., 2005), comparativement aux lots témoins ou aux lots traités par la testostérone. Les effets positifs du fadrozole sur la croissance sont généralement liés à l'effet inhibiteur de l'aromatisation des androgènes, qui conduit à une réduction des taux circulants des œstrogènes, et en conséquence à une augmentation des niveaux d'androgènes (Huffman et al., 2013). Des travaux ayant montré que chez le tilapia du Nil, si les androgènes ont un effet positif sur la croissance (effet androgénique anabolisant), l'œstradiol (E2) a un effet négatif sur la croissance (Baroiller et al., 2014), un changement du ratio androgènes / œstrogènes peut donc efficacement affecter la croissance.

Dans le cadre de notre étude, la croissance des tilapias du Nil élevés à 37°C était plus faible que celle des individus XX masculinisés par le fadrozole ou par la 17MT, mais similaire à celle des mâles génétiques XY. Ce résultat diffère des précédents travaux qui relevaient que les fortes températures pouvaient avoir des effets néfastes sur la croissance du tilapia du Nil (Baras et al., 2001 ; Azaza et al., 2008), notamment en raison du fait que les températures masculinisantes sont nettement supérieures à l'optimum thermique de croissance chez l'espèce étudiée (Azaza et al., 2008), et donc susceptibles d'affecter, entre autres, l'appétit et la prise alimentaire des lots traités (Jobling, 1997). Dès lors, l'absence de différences de croissance entre les lots génétiquement femelles élevés à 37°C (et masculinisés) et celle des mâles génétiques XY pourrait simplement traduire un effet paternel : en effet, si tous les ovules provenaient d'un même pool de femelles XX, en revanche, le sperme provenait de 2 stocks différents, l'un issu de mâles XX et l'autre de mâles YY. Or, des travaux antérieurs ont démontré que les mâles YY peuvent grossir moins vite que les mâles XX et XY (Toguyéni et al., 2002). Il est donc possible que la croissance relativement faible des mâles génétiques XY-29°C pendant la période des traitements, résulte d'un effet paternel lié à la croissance plus faible des géniteurs mâles YY. Dans la mesure où les performances de ces deux stocks paternels n'ont pas été testées comparativement avant fécondation, où la croissance est un caractère héritable (Charo-Karisa et al., 2006) et où la contribution paternelle est souvent sous-estimée, on ne peut exclure des potentiels de croissance différents, transmis par les deux stocks de mâles XX et YY.

Si l'on compare le traitement au fadrozole et celui à forte température, tous les deux vont induire une diminution des niveaux d'œstrogènes, en inhibant respectivement l'activité aromatasase pour le premier, et l'expression du gène *cyp19a1a* pour le second.

Pendant la période d'élevage en commun, la différence de croissance entre les mâles et les femelles génétiques était moins marquée. De même, les taux de croissance entre les mâles génétiques XY et les mâles XX induits par des traitements chimiques étaient similaires, confirmant que les différences constatées pendant la période de traitement ont des effets durables, s'expliquant par les effets androgéniques/anabolisants des androgènes (Golan et Levavi-Sivan, 2014) ou par la diminution induite des taux d'œstrogènes *via* l'inhibition de l'expression du gène de l'aromatase (Bhandari et al., 2006), 2), et/ou la diminution de l'activité enzymatique de l'aromatase gonadique (Golan et Levavi-Sivan, 2014).

Les poissons masculinisés à 37°C, ont présenté deux phases de croissance : faibles pendant les premières semaines suivant la mise en élevage commun, leurs croissances ont ensuite été comparables à celles des poissons masculinisés par traitement chimique et à celles des mâles génétiques. En général, chez le tilapia du Nil, le passage d'une température élevée à une température proche de l'optimum de croissance s'accompagne d'une croissance plus élevée (Baras et al., 2001). Dans notre étude, les poissons avaient été triés préalablement à la phase d'élevage commun, de manière à disposer d'individus de poids comparables pour tous les lots traités. Dans le lot XX-37°C, seuls les plus petits individus étaient dans la gamme de taille recherchée. Il est donc possible que ces plus petits poissons étaient soit des « dominés », soit aient soufferts davantage que les autres de l'élevage à forte température. Ce statut initial a ensuite contribué à affecter négativement leur croissance dans les premiers jours ou semaines suivant la mise en élevage commun. Par la suite, leur croissance est redevenue similaire à celle des mâles des autres traitements.

Cette comparaison permet de dire que la forte température peut être une alternative aux traitements chimiques pour la masculinisation du tilapia du Nil, bien qu'il y existe une faible croissance au départ et une faible survie. Cependant, ces problèmes pourraient être résolus par la sélection de lignées plus adaptées aux fortes températures et / ou présentant de forts taux de masculinisation à des températures moins élevées. La thermosensibilité est un trait héritable et rapidement sélectionnable, puisqu'en 3 générations, plus 93% de mâles peuvent être produits par un simple traitement thermique durant les 10 jours qui suivent la résorption de la vésicule vitelline (Wessels et Hörstgen-Schwark, 2007; Baroiller et al., 2009 ; Wessels et Hörstgen-Schwark, 2011).



### 3. Du profil d'expression de certains gènes clé de la différenciation sexuelle et de la masculinisation

Nos travaux ont analysé l'expression de différents gènes dans les gonades et dans le système nerveux central durant la différenciation naturelle ou induite par différents types de traitements masculinisant.

A 14 dpf on observe dans les gonades des individus XY une expression précoce de *dmrt1* puis de *amh* qui n'est pas retrouvée chez les alevins XX. Chez les femelles, l'augmentation de *cyp19a1a* et de *foxl2* déjà rapportée (D'Cotta et al., 2001 ; Ijiri et al., 2008 ; Poonlaphdecha et al., 2013) a été observée dans la présente étude. Dans des études de transactivation, *foxl2* a été démontré comme étant un activateur de la transcription de *cyp19a1a* du fait de sa liaison sur le promoteur de l'aromatase (Wang et al., 2007 ; Yamaguchi et al., 2007). Contrairement à la majorité des études, nos travaux n'ont pas démontré de corrélation spatio-temporelle de *foxl2* et de *cyp19a1a*. Chez les individus XX masculinisés par les différents traitements, on note une augmentation concomitante de l'expression de *dmrt1* et de *amh*. Cette augmentation apparaît très rapidement chez les individus traités par la température (dès 4 jours après le début du traitement), et plus tardivement pour les autres traitements masculinisant. Ces résultats suggèrent que la température déclenche la voie mâle dans les gonades beaucoup plus rapidement que ne le font les traitements par le fadrozole ou la 17MT. Le déclenchement de cette voie mâle est suivie ensuite par un blocage de la voie femelle avec une inhibition de l'expression du gène de l'aromatase *cyp19a1a* et de *foxl2* conduisant sans doute à la suppression de la production d'œstrogènes chez les mâles traités par la température et le fadrozole. Chez les mâles traités par la 17MT, nous n'observons pas de diminution de ces deux gènes femelles qui, chez les juvéniles prématures (110 jpf) ont les mêmes niveaux d'expression de l'aromatase que les femelles génétiques.

Cette étude indique que la masculinisation par la 17MT passe par une autre voie que celle de la température et du fadrozole, probablement à travers les récepteurs aux androgènes. Des études récentes ont effectivement démontré que le blocage par la flutamide (antagoniste des récepteurs d'androgènes) des traitements par la 17MT (aromatisable) et la DHT (non aromatisable) diminuait leur efficacité de masculinisation, suggérant l'implication des récepteurs aux androgènes dans leur action (Golan et Levavi-Sivan, 2014). La réduction de la synthèse de l'œstradiol par *dmrt1* repose sur la suppression de la transcription de l'aromatase par fixation de *dmrt1* sur son promoteur (Wang et al., 2010).



Au cours des 3 stades analysés, le niveau de *dmrt1* augmente de plus en plus chez les mâles masculinisés par les traitements pour atteindre à 110 jpf des valeurs considérablement plus élevées que ce que l'on observe chez les mâles génétiques.

Notre étude dans le cerveau du tilapia du Nil, confirme l'existence d'un dimorphisme du gène de l'*amh* retrouvé chez les mâles génétiques de 14 jpf (Poonlaphdecha et al., 2011). Nous avons mis en évidence que ce dimorphisme perdure jusqu'au stade de 110 dpf. Le dimorphisme de l'*amh* cerveau est précoce, avant que ce gène ne soit exprimé dans les gonades, suggérant que la différenciation sexuelle du cerveau pourrait intervenir avant/ou simultanément celle de la gonade. A ce stade la gonade n'est pas encore différenciée et probablement les niveaux d'œstrogènes dans la gonade sont encore faibles.

L'augmentation du niveau d'expression du gène de l'aromatase *cyp19a1b* pourrait être un signe de masculinisation. En effet nos travaux ont démontré que le gène de l'aromatase du cerveau *cyp19a1b* est davantage exprimé chez les femelles masculinisées par les différents traitements que chez les mâles et les femelles génétiques, avec une expression de *cyp19a1b* légèrement plus élevée chez les mâles. De précédentes études ont révélé que l'aromatase du cerveau est exprimée chez le tilapia à un âge plus précoce que celui de notre étude mais il n'y avait pas de différence de niveau d'expression entre les mâles et les femelles (Kwon et al., 2001 ; Chang et al., 2005). D'Cotta et al. (2001a) ont relevé une plus forte activité de l'aromatase dans le cerveau des femelles comparativement aux mâles, et le traitement à 35°C diminuait ces activités dans les deux sexes. La non corrélation entre les niveaux d'expression de *cyp19a1b* et l'activité de l'aromatase indique une régulation à plusieurs niveaux (génomique et post-traduction) qui reste à identifier. Aucune différence dans l'expression des récepteurs des estrogènes *era* and *erβ* n'a été mise en évidence entre les mâles et femelles génétiques. Des résultats différents ont été observés dans le cerveau des mâles chez la truite arc-en-ciel avec une augmentation (juste pendant la différenciation sexuelle) parallèle des trois récepteurs d'œstrogènes d'un côté et de l'expression et l'activité de l'aromatase cerveau (Vizziano-Cantonnet et al., 2011). Dans notre étude une analyse globale a été réalisée dans la tête et cerveau des tilapias et il serait nécessaire d'analyser plus finement ses régions pour voir s'il existe une différence spécifique liée au sexe. Les traitements par le fadrozole ont conduit à une masculinisation de la totalité des individus traités. Elle résulte sans doute d'une diminution de la synthèse des œstrogènes dans les gonades par l'inhibition de l'activité aromatase par le fadrozole. Guiguen et al. (1999) et Kwon et al. (2000) avaient trouvé dans la gonade une diminution des taux circulant d'œstradiol chez les individus traités au fadrozole. Dans le cerveau, le traitement par le fadrozole a au contraire stimulé l'expression de *cyp19a1b*. Les traitements masculinisant par la température stimulent très fortement (30 fois

plus) *cyp19a1b* dès 14 jpf. Le fadrozole stimule également *cyp19a1b* mais plus légèrement que la température. L'augmentation de l'expression de *cyp19a1b* indique une augmentation très précoce de la synthèse neuronale des œstrogènes chez les individus masculinisés. L'action des œstrogènes sur le gène de l'aromatase passe par des EREs « estrogen responsive elements » situés sur le promoteur du gène de l'aromatase cerveau (Diotel et al., 2010 ; Böhne et al., 2013).

Dans notre étude, l'expression de l'aromatase cerveau *cyp19a1b* augmente dans tous les groupes avec l'âge des poissons, suggérant une augmentation de l'activité de l'enzyme et une plus forte synthèse de neuro-œstrogènes. Cette augmentation serait une caractéristique des poissons permettant une neurogenèse continue qui pourrait expliquer la grande plasticité de l'organisation du cerveau toute au long de leur vie, et ainsi expliquer leur capacité de changer de sexe même à des âges adultes (Piferrer & Blazquez, 2005 ; Diotel et al., 2010 ; 2011).

Notre travail a démontré que des traitements masculinisant par le fadrozole induit une suppression de l'expression du gène *amh* dans le cerveau et que cette suppression perdure même après l'arrêt de l'inhibition de l'enzyme de l'aromatase. Ce résultat est fort intéressant et suggère une régulation directe ou indirecte entre les œstrogènes et l'*amh* dans le cerveau. Les niveaux plus faibles d'œstrogènes pourraient avoir supprimé l'expression de l'*amh*. Notre hypothèse est que l'*amh* dans le cerveau joue un rôle important dans la masculinisation de celui-ci. Des travaux sont nécessaires pour établir quel est ce rôle. Il serait aussi intéressant de savoir si les poissons traités au fadrozole ont une physiologie reproductive normale, et s'ils ont ou non un comportement reproducteur mâle. Chez les tilapias comme chez d'autres cichlidés le comportement pendant la reproduction constitue un facteur clef pour le succès de la reproduction.

Notre travail a démontré également que les expressions dans le cerveau des mâles 17MT sont différentes de celles de poissons masculinisés par la température et par le fadrozole, et ressemblent davantage à ceux des mâles génétiques. Ces résultats suggèrent une régulation différente des réseaux géniques entre ces mâles et donc probablement un environnement endocrinien différent.

#### **4. Principales conclusions**

Chez le tilapia du Nil, les différences entre femelles et mâles génétiques d'un côté puis entre mâles génétiques et mâles induits par différentes méthodes de masculinisation ont été

recherchées et interprétées en termes de croissance, de survie, de morphologie, de profil d'expressions de gènes clés de la différenciation sexuelle tant au niveau du système nerveux central qu'au niveau des gonades du tilapia. Les stades étudiés couvrent la différenciation sexuelle et la première gamétogenèse. Les résultats obtenus apportent des informations aussi bien sur les performances relatives des mâles issus des différentes méthodes de traitement que sur certains processus moléculaires en cours pendant la différenciation testiculaire naturelle ou induite.

Pour réaliser ce travail, nous avons développé différentes approches:

- pour la synchronisation des pontes femelles des plans de croisements qui permettent de s'affranchir en partie d'effets parentaux.
- une méthode de marquage individuel des tilapias du Nil à partir d'un poids de 200 mg ou de 400 mg s'il est impératif que la marque n'influence pas significativement la croissance des poissons. Nos résultats mettent en évidence que le ratio critique de 2-2.5% du poids des marques rapportée au poids du corps des poissons, ne suffit pas pour se prémunir de conséquences négatives sur la croissance d'individus de très petite taille, eu égard à la difficulté d'effectuer une intervention chirurgicale non nocive en deçà d'une taille minimale. Concernant la survie et la croissance des animaux issus des différents traitements, il apparaît que :

- les fortes températures peuvent constituer une alternative aux traitements chimiques pour la masculinisation du tilapia du Nil, malgré la faible croissance de départ. Pour cela, il conviendra de réaliser une sélection de lignées thermosensibles supportant mieux ces traitements par les fortes températures.
- La croissance est aussi sous l'influence des stéroïdes sexuels, et probablement du ratio androgènes/oestrogènes, ce qui explique en partie la mauvaise croissance des femelles chez le tilapia du Nil.

L'analyse des profils d'expression de certains gènes clés de la différenciation sexuelle dans le cerveau et la gonade a montré que les traitements masculinisant modifient de façon pérenne le niveau d'expression de certains d'entre eux:

- La masculinisation se traduit à la fois par de faibles niveaux d'expression de la forme gonadique *cyp19a1a* et au contraire des niveaux élevés de sa forme cérébrale *cyp19a1b*.
- L'augmentation de l'expression de *cyp19a1b* dans le cerveau semble constituer une bonne signature d'un traitement de masculinisation.
- Les gènes spécifiques de la voie mâle, tels que *dmrt1* et *amh*, sont fortement et rapidement exprimés dans la gonade des lots subissant des traitements masculinisant.

## 5. Perspectives

L'une des originalités de ce travail repose sur l'analyse parallèle des processus moléculaires de la différenciation au niveau de la gonade et du système nerveux central. Nous pensons qu'il particulièrement intéressant de continuer l'étude à ces deux niveaux.

Au niveau des gonades, nous proposons d'étudier :

- le rôle des récepteurs aux androgènes et de la 11 $\beta$  hydroxylase dans la masculinisation induite par les différentes approches.
- l'interaction des différents gènes analysés avec des régulateurs de la stéroïdogénèse comme *sf1* et *dax1*.
- les possibles effets épigénétiques de ces traitements à travers la méthylation de gènes clés de la différenciation du sexe comme *cyp19a1a*.

Au niveau du cerveau:

- il nous semble intéressant d'analyser l'implication des récepteurs aux gonadotropines et des récepteurs aux androgènes dans la différenciation des gonades, en particulier lors de traitements masculinisants.
- le travail réalisé a considéré le cerveau dans sa globalité. Il nous semble intéressant de localiser plus finement l'expression des acteurs majeurs comme *cyp19a1b*, les *ers*, et l'*amh* lors de la différenciation naturelle et induite.
- La compréhension du rôle de l'*amh* et de son récepteur *amhr2* nécessite de mieux décrire les processus morpho-anatomiques dans les régions du cerveau où se localise son expression. Pour cela, il sera nécessaire de produire des anticorps spécifiques de ces deux protéines, et de développer des approches de knockdown.

Enfin, nous avons étudié la croissance des adultes produits par les différents types de traitement. Il conviendra de caractériser également les paramètres de la reproduction (y compris le comportement) chez les individus.

## Références Bibliographiques



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abucay J.S., Mair G.C., Skibinski D.O.F., and Beardmore J.A., 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio of *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 173, 219–234.
- Adkins-Regan E. and Reeve H.K., 2014. Sexual Dimorphism in Body Size and the Origin of Sex-Determination Systems. Am. Nat., 183, 519–536.
- Adkins-Regan E., 1981. Early organizational effects of hormones. An evolutionary perspective. In: Adler, N. T. (Ed.), Neuroendocrinology of Reproduction: Physiology and behavior. Plenum, New York, pp. 159-228.
- Afonso L.O.B., Wassermann G.J., and de Oliveira R.T., 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a non-steroidal aromatase inhibitor. J. Exp. Zool. 290, 177-181.
- Alexander R.M., 1966. Physical aspects of swim bladder function. Biol. Rev. 41, 141-176.
- Allanson B.R. and Noble R.G., 1984. The tolerance of Tilapia mossambica to high temperatures. Trans. Fish. Soc. 93, p323-332.
- Allison R., Smitherman R.O., and Cabrero J., 1976. Effet of high density culture on reproduction and yield of Tilapia aurea. FAO Tech. Conf. on Aquaculture, Kyoto, Japan, AQ/Conf./76/E. 47, 3p.
- Almeida O.G., Miranda A., Frade P., Hubbard P.C., Barata E.N., and Canario A.V.M., 2005. Urine as a social signal in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Chem. Senses 30, I309–I310.
- Antilla E., 1984. Steroid conversion by oocytes and the early embryos of *Salmo gairdneri*. Ann. Zool. Fenn. 21, 465-476.
- Arrignon J., 1969. L'élevage de Tilapia mossambica comme animal de laboratoire. Verh. Int. Ver. Theor. Angex. Limnol 17, p 650-661.

Azaza M.S., Legendre M., Kraiem M.M., and Baras E., 2010. Size-dependent effects of daily thermal fluctuations on the growth and size heterogeneity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. J. Fish Biol. 76, 669-683.

Azaza M.S., Dhraïef M.N., and Kraiem M.M., 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. J. Thermal Biol. 33, 98–105.

## B

Balaban M.O., Chombeau M., Cîrban D., and Gümüş B., 2010a. Prediction of the weight of Alaskan pollock using image analysis. J. Food. Sci., 75, E552-E556.

Balaban M.O., Ünal Şengör G.F., Soriando M.G., and Ruiz E.G., 2010b. Using image analysis to predict the weight of Alaskan salmon of different species. J. Food. Sci., 75, E157-E162.

Balthazart J., Charlier T.D., Comil C.A., Dickens M.J., Harada N., Konkle A.T.M., Voigt C., Ball G.F., 2011. Sex differences in brain aromatase activity:genomic and non-genomic controls. Front. Endocrinol (2) 34, 1-13.

Baras E. and Westerloppe L., 1999. Transintestinal expulsion of surgically implanted tags by African catfish *Heterobranchus longifilis* of variable size and age. Trans. Am. Fish. Soc., 128, 737-746.

Baras E. and Mélard C., 1997. Individual growth patterns of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.): Emergence and dynamics of sexual growth dimorphism. Northeast Reg. Agric. Serv. 106, 169–177.

Baras E., Jacobs B., and Mélard C., 2001. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 192, 187–199.

Baras E., Malbrouck C., Houbart M., Kestemont P., and Mélard C., 2000. The effects of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. Aquaculture, 185, 159-173.



- Baras E., Westerloppe L., Mélard C., Philippart J.C., and Bénéch V., 1999. Evaluation of implantation procedures for PIT-tagging juvenile Nile tilapia. *N. Am. J. Aquacult.*, 61, 246-251.
- Baras E., Jacobs B., and Mélard C., 2001. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 192, 187–199.
- Barata E.N., Fine J.M., Hubbard P.C., Almeida O.G., Frade P., Sorensen P.W., and Canario A.V.M., 2008. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *J. Chem. Ecol.* 34, 438–449.
- Barata E.N., Hubbard P.C., Almeida O.G., Miranda A., and Canario A.V., 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biol.* 5, 54.
- Bard J., de Kimpe P., Lemasson J., and Lessent P., 1974. Manuel de pisciculture tropicale. Centre technique forestier tropical. 209p.
- Baroiller J.F., 1988. Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez *Oreochromis niloticus*. Thèse dr., Univ. Pierre-et-Marie-Curie, Paris. pp. 89.
- Baroiller J.F., Clota F., and Geraz E., 1995a. Temperature sex determination in two tilapia, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high or low temperature. In: Goetz, F.W. and Thomas, P. (eds.). Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproduction Physiology of Fish. USA., 158-160.
- Baroiller J.F., Chourrout D., Fostier A., and Jalabert B., 1995b. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273, 216-223.
- Baroiller J.F., D'Cotta H., Bezault E., Wessels S., and Hoerstgen-Schwark G., 2009a. Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 153, 30–38.
- Baroiller J.F., D'Cotta H., and Saillant E., 2009b. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex Dev.* 3, 118–135.

- Baroiller J.F. and Clota F., 1998. Interactions between temperature effects and genotype on *Oreochromis niloticus* sex determination. J. Exp. Zool. 281, 507.
- Baroiller J.F. and D'Cotta H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 130, 399–409.
- Baroiller J.F. and Toguyéni A., 1996. Comparative effects of aa natural androgen, 11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione, and a synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the sex ratios of *Oreochromis niloticus*. pp. 238-245. In R.S.V. Pullin, J.Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds.). The third international symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conf. Proc. 41, 575p.
- Baroiller J.F., D'Cotta H., Shved N., Berishvili G., Toguyeni A., Fostier A., Eppler E., and Reinecke M., 2014. Oestrogen and insulin-like growth factors during the reproduction and growth of the tilapia *Oreochromis niloticus* and their interactions Gen. Comp. Endocrinol. In press.
- Baroiller J.F., Fostier A., Cauty C., Rognon X., Jalabert B., 1996. Significant effects of high temperatures on sex ratio of progenies from *Oreochromis niloticus* with sibling sex-reversed male broodstock. In : Pullin R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon Kothias J.B., Pauly, D. (Eds.), Proceedings of the Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings 41, 333–343.
- Baroiller J.F., Fostier A., and Jalabert B., 1988. Precocious steroidogenesis in the gonads of *Oreochromis niloticus* during and after sexual differentiation. p. 137-141. In Y. Zohar and B. Breton (eds.) Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics. Les Colloques de l'INRA N°44.
- Baroiller J.F., Guiguen Y., and Fostier A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell Mol Life Sci 55, 910–931.
- Baroiller J.F. and Jalabert B., 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. Aquat. Living Resour. 2,105–116.
- Baron D., Cocquet J., Xia, X., Fellous M., Guiguen, Y., and Veitia R.A., 2004. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. J. Mol. Endocrinol. 33, 705–715.

- Baron D., Houlgatte R., Fostier A., and Guiguen Y., 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 73, 959–966.
- Baron D., Montfort J., Houlgatte R., Fostier A., and Guiguen Y., 2007. Androgen induced masculinization in rainbow trout results in a marked dysregulation of early gonadal gene expression profiles. *BMC Genomics* 8, 357 doi:10.1186/1471-2164-8-357.
- Barry T.P., Marwah A., and Marwah P., 2007. Stability of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in fish feed. *Aquaculture* 271, 523–529.
- Bayunova L., Semenkova T., Canario A.V.M., Gerasimov A., and Barannikova I., 2011. Free and conjugated androgen and progestin levels in the serum of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*, Pallas) males treated with female coelomic fluid. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 655–659.
- Beardmore J.A., Mair G.C., and Lewis R.I., 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197, 283–301.
- Beckman B. R., 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 233–252.
- Berishvili G., D’Cotta H., Baroiller J.F., Segner H., and Reinecke M., 2006. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 204–10.
- Berishvili G., Baroiller J.F., Eppler E., and Reinecke M., 2010. Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 128–134.
- Berlinsky D.L., William K., Hodson R.G., and Sullivan C.V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J. World Aquat. Soc.* 28, 79– 86.
- Bezault E., Clota F., Derivaz M., Chevassus B., and Baroiller J.F., 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture* 272S1, S3–S16.

- Bhandari R.K., Nakamura M., Kobayashi T., and Nagahama Y., 2006. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 145, 20–24.
- Billard R., 1989. Endocrinology and fish culture. Fish Physiol. Biochem. 7, 49–58.
- Biswas A.K., Morita T., Yoshizaki G., Maita M., and Takeuchi T., 2005. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. Aquaculture 243, 229-239.
- Blázquez M. and Piferrer F., 2005. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissuespecific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation. Mol. Cell. Endocrinol. 237, 37–48.
- Böhne A., Heule C., Boileau N., and Salzburger W., 2013. Expression and sequence evolution of aromatase cyp19a1 and other sexual development genes in East African Cichlids fishes. Mol Biol. Evol. 30, 2268-2285.
- Bolland J.D., Cowx I.G., and Lucas M.C., 2009. Evaluation of VIE and PIT tagging methods for juvenile cyprinid fishes. J. Appl. Ichthyol., 25, 381-386.
- Bolland J.D., Cowx I.G., and Lucas M. C., 2009. Evaluation of VIE and PIT tagging methods for juvenile cyprinid fishes. Journal of Applied Ichthyology 25, 381-386.
- Bromage N.R., Porter M., and Randall C.F., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture 197, 63– 98.
- Brummett R.E., 1995. Environmental regulation of sexual maturation and reproduction in tilapia. Reviews in Fisheries Science 3, 231–248.
- Buchet V., Coquard E., Sévère A., and Barone H., 2008. Influence of tank volume on vitellogenesis and spawning performances in sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Aquat. Res. 39, 420–426.
- Bull J.J., 2008. Sex determination: Are two mechanisms better than one? J. Biosciences, 33, 5-8.

## C

- Callard G., Schlinger B., and Pasmanik M., 1990. Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions. *J. Exp. Zool.* 256 S4, 6-16.
- Callard G.V. and Tchoudakova A., 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 61, 387-392.
- Callard G.V., Tchoudakova A.V., Kishida M., and Wood E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 305–314.
- Campos-Mendoza A., McAndrew B.J., Coward K., and Bromage N., 2004. Reproductive response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to photoperiodic manipulation, effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. *Aquaculture* 231 (16), 299–314.
- Carleton K.L., Streelman J.T., Lee B.-Y., Garnhart N., Kidd M., and Kocher T.D., 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Anim. Gen.*, 33, 140-144.
- Cerdá J., Selman K., and Wallace R.A., 1996. Observations on oocyte maturation and hydration in vitro in the black sea bass, *Centropristis striata* (Serranidae). *Aquat. Living Resour.* 9, 325–335.
- Chaboissier M.C., Kobayashi A., Vidal V.I.P., Lützkendorf S., van de Kant H.J.K., and Wegner M., 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.
- Chakraborty S., Levenson A.S., and Biswas P.K., 2013. Structural insights into Resveratrol's antagonist and partial agonist actions on estrogen receptor alpha. *Structural Biology* 13, 27.
- Chakraborty M. and Burmeister S.S., 2010. Sexually dimorphic androgen and estrogen receptor mRNA expression in the brain of túngara frogs. *Hormones and Behavior* 58, 619-627.
- Chakraborty S.B., Banerjee S., and Chatterjee S., 2011. Increased androgen receptor expression in muscle tissue contributing to growth increase in androgen-treated Nile tilapia. *Aquaculture International* 19, 1119-1137.

- Chang X., Kobayashi T., Senthilkumaran B., Kobayashi-Kajura H., Sudhakumari C.C., and Nagahama Y., 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 141,101–115.
- Chang X.T., Kobayashi T., Todo T., Ikeuchi T., Yoshiura Y., Kajiura-Kobayashi H., Morrey C., and Nagahama Y., 1999. Molecular cloning of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. Sci.* 16, 653-658.
- Charo-Karisa H., Rezk M.A., Bovenhuis H., and Komen H., 2005. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* 249, 115–123.
- Chi M.L, Wen H.S., NI M., He F., Li J.F., Qian K., Zhang P., Chai S.H., Ding Y.X, and Yin X.H., 2014. Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the responses to hormones stimulation in testis of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*). *Steroids* 84, 92-102.
- Chiang E.F., Yan Y.L., Guiguen Y., Postlethwait J., and Chung B., 2001. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18, 542–550.
- Chung-Davidson Y.-W., Huertas M., and Li W., 2011. A review of research in fish pheromones. In: Thiel, M., Breithaupt, T. (Eds.), *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, New York, pp. 467–482.
- Clarke T.R., Hoshiya Y., Yi S.E., Liu X., Lyons K.M., and Donahoe P.K., 2001. Müllerian-inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. *Mol. Endocrinol.* 15, 946–959.
- Clemens H.P. and Inslee T., 1968. The production of unisexual broods by Tilapia mossambica sex reversed with methyltestosterone. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 97, 18-21.
- Cnaani A., 2013. The tilapias' chromosomes influencing sex determination. *Cytogenetics and Genome Research*, 141(2-3), 195-205.
- Cnaani A., Lee B.-Y., Zilberman N., Ozouf-Costaz C., Hulata G., Ron M., D'Hont A., Baroiller J.F., D'Cotta H., Penman D.J., Tomasino E., Coutanceau J.-P., Pepey E., Shirak A., and Kocher T.D., 2008. Genetics of Sex Determination in Tilapiine Species. *Sexual Development* 2, 43-54.

- Cnanni A. and Levavi-Sivan B., 2009. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sexual Development* 3, 165-176.
- Coche A.G., 1982. Cage culture of tilapias. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapia*. ICLARM Conference Proceedings, vol. 7. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp. 205–246.
- Cooke P.S., Young P., Hess R.A., and Cunha G.R., 1991. Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology* 128, 2874–2879.
- Cooke S.J., Woodley C.M., Eppard M.B., Brown R.S., and Nielsen J.L., 2011. Advancing the surgical implantation of electronic tags in fish: a gap analysis and research agenda based on a review of trends in intracoelomic tagging effects studies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21, 127-151.
- Costa C., Antonucci F., Boglione C., Menesatti P., Vandeputte M., and Chatain B., 2013. Automated sorting for size, sex and skeletal anomalies of cultured seabass using external shape analysis. *Aquacult. Eng.* 52, 58-64.
- Cousin X., Daouk T., Péan S., Lyphout L., Schwartz M.-E., and Bégout M.-L., 2012. Electronic individual identification of zebrafish using radio frequency identification (RFID) microtags. *J. Exp. Biol.* 215, 2729-2734.
- Coward K., Bromage N.R., and Little D.C., 1998. Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate spawning *Tilapia zillii*. *J. Fish Biol.* 52 , 152–165.

## D

- D'Cotta H., Fostier A., Guiguen Y., Govoroun M., and Baroiller J.F., 2001b. Search for the molecular mechanisms implicated in the thermosensitivity of sex gonadal differentiation of tilapia fish: differential approach and expression of candidate genes. *J. Exp. Zool.* 290, 574–585.
- D'Cotta H., Pepey E., Pfennig F., Bienvenu D., Gutzeit H.O., Volff J.N., Wenning M., and Baroiller J.F., 2007. Sox9a, Sox9b and Amh are up-regulated in the gonads during natural and temperature-induced tilapia male differentiation. *Proceedings of the 8th*



International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, June 3rd–8th, Saint-Malo, France.

- D'Cotta H., Fostier A., Guiguen Y., Govoroun M., and Baroiller J.F. 2001a. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 265–276.
- Dadzie S. and Wangila B.C.C., 1980. Reproductive Biology, length-weight relationship and relative condition of pond raised *Tilapia zillii*. *J. Fish. Biol.* 17, p 243-253.
- Davis L.K., Pierce A.L., Hiramatsu N., Sullivan C.V., Hirano T., and Grau E.G., 2008. Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 $\beta$ -estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 544-551.
- de Gooyer M.E., Oppers-Tiemissen H.M., Leysen D., Verheul H.A.M., and Kloosterboer H.J., 2003. Tibolone is not converted by human aromatase to 7 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -ethynylestradiol (7 $\alpha$ -MEE): Analyses with sensitive bioassays for estrogens and androgens and with LC-MSMS. *Steroids* 68, 235-243.
- Decourtye A., Devillers J., Aupine, P., Brun F., Bagnis C., Fourrier J., and Gauthier M., 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20, 429-437.
- Denzer H.W., 1968. Studies on the physiology of young *Tilapia*. *FAO Fish. Rep.* 4, p356-366.
- Desprez D. and Mélard C., 1998. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, *Aquaculture* 162, 79–84.
- Desprez D., Mélard C., Hoareau M.C., Bellemène Y., Bosca P., and Baroiller J.F., 2003. Inheritance of sex in two ZZ pseudofemale lines of tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 218, 131–140.
- Devlin R.H. and Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Dia P.M., 2013. Caractérisation génétique d'une souche domestique du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en vue de la mise en place d'une traçabilité moléculaire des géniteurs. M.Sc, Université Montpellier 2. France 24 pp.

- di Clemente N., Josso N., Gouédard L., and Belville C., 2003. Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads. *Mol. Cell Endocrinol.* 211, 9-14.
- DiNapoli L. and Capel B., 2008. SRY and the standoff in sex determination. *Mol. Endocrinol.* 22(1), 1-9.
- Diotel N., Le Page Y., Mouriec K., Tong S.-K., Pellegrini E., Vaillant C., Anglade I., Brion F., Pakdel F., Chung B.-C., and Kah O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol.* 31, 172–192.
- Diotel N., Rego J.L., Anglade I., Vaillant C., Pellegrini E., Gueguen M.M., Mironov S., Vaudry H., and Kah O., 2011. Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* 34, 45–56.
- Dorrington J.H., Moon Y.S., and Armstrong D.T., 1975. Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97, 1328–1331.
- Drori S., Ofir M., Levavi-Sivan B., and Yaron Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* 119, 393–407.
- Du Q.Y., Wang F.Y., Hua H.Y., and Chang Z.J., 2007. Cloning and study of adult-tissue-specific expression of Sox9 in *Cyprinus carpio*. *J. Genet.* 86, 85–91.
- Dulka J.G., Stacey N.E. Sorensen., P.W., and Vanderkraak G.J., 1987. A steroid sex pheromone synchronizes male–female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325, 251–253.
- Duponchelle F. and Panfili J., 1998. Variations in age and size at maturity of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, populations from man-made lakes of Côte d’Ivoire. *Environ. Biol. Fishes* 52, 453–465.
- Duston J. and Bromage N., 1988. The entrainment and gating of the endogenous circannual rhythm of reproduction in the female rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 164A, 259–268.
- Duston J., Astatkie T., and MasIsaac P.F., 2003. Long-to-short photoperiod in winter halves the incidence of sexual maturity among Arctic charr. *Aquaculture* 221, 567–580.

El-Greisy Z.A., and El-Gamal A.E., 2012. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. Egyptian J. Aquat. Res. 38, 59-66.

Esterhuysen M.M., Helbing C.C., van Wyk J.H., 2008. Temporal expression of two Cytochrome P450 Aromatase isoforms during development in *Oreochromis mossambicus*, in association with histological development. Comp. Biochem. Physiol. D, 297–306.

Eyeson K.N., 1983. Stunting and reproduction in pond-reared *Sarotherodon melanotheron*. Aquaculture 31. P 257-267.

## F

FAO, 2010. The state of World Fisheries and Aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture, Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014. 223 pp.

Feist G. and Schreck C.B., 1996. Brain-pituitary-gonadal axis during early development and sexual differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 102, 394-409.

Fernandino J.I., Hattori R.S., Kimura H., Strüssmann C.A., and Somoza G.M., 2008a. Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. Dev. Dyn. 237, 3192–3199.

Fernandino J.I., Hattori R.S., Shinoda T., Kimura H., Strobl-Mazzulla P.H., Strüssmann C. A., Somoza G.M., 2008b. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Sex Dev. 2, 316–324.

Ficke A.D., Myrick C.A., and Kondratieff M.C., 2012. The effects of PIT tagging on the swimming performance and survival of three nonsalmonid freshwater fishes. Ecol. Eng. 48, 86-91.

Finn R.N., 2007. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: a conserved mechanism of oocyte hydration. Biol. Reprod. 76, 936–948.

- Fitzpatrick M. S., Gale M. L., and Schreck C. B., 1994. Binding characteristics of an androgen receptor in the ovaries of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 399-408.
- Fitzpatrick S.L. and Richards J.S., 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger RNA and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. Endocrinology 129, 1452–1462.
- Fitzpatrick S.L. and Richards J.S., 1994. Identification of a cyclic adenosine 30, 50-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C Leydig cells. Mol. Endocrinol. 8, 1309–1319.
- Forlano P.M., Deitcher D.L., and Bass A.H., 2005. Distribution of estrogen receptor alpha mRNA in the brain and inner ear of a vocal fish with comparisons to sites of aromatase expression. J. Comp. Neurol. 483, 91–113.
- Forlano P.M., Deitcher D.L., Myers D.A., and Bass A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J. Neurosci. 21, 8943–8955.
- Forlano P.M., Schlinger B.A., and Bass A.H., 2006. Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. Front Neuroendocrinol. 27, 247-274.
- Fostier A., Jalabert B., Billard R., Breton B., and Zohar Y., 1983. The gonadal steroids. In “Fish Physiology” (W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds.), Vol. 9A, pp 277-372. Academic Press, New York.
- Fuentes E. N., Valdés J. A., Molina A., and Björnsson B.T., 2013. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system. Gen. Comp. Endocrinol. 192, 136-148.

## G

- Gennotte V., François E., Rougeot C., Ponthier J., Deleuze S., and Mélard C., 2012. Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Theriogenology 78, 210-217.
- Gharrett A.J. and Seeb J.E., 1990. Practical and theoretical guidelines for genetically marking fish populations. Am. Fish. Soc. Symp. 7, 407-417.

- Gheorghiu C., Hanna J., Smith J.W., Smith D.S., and Wilkie M.P., 2010. Encapsulation and migration of PIT tags implanted in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 298, 350-353.
- Gillet C., Breton B., and Mikolajczyk T., 1996. Effects of GnRHa and pimozone treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 C. *Aquat. Living Resour.* 9, 257–263.
- Giulii G., Shen W.-H., and Ingraham H. A., 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian inhibiting substance, in vivo. *Development* 124, 1799–1807.
- Godwin J., 2010. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 31, 203–216.
- Goetz F. W., Donaldson E. M., and Hunter G. A., 1979. Effects of estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 17, 267-278.
- Golan M. and Levavi-Sivan B., 2014. Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *Gen. Comp. Endocrinol.* In press.
- Gonzalez A. and Piferrer F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 223–230.
- Govoroun M., Mcmeel O.M., D’Cotta H., Ricordel M.J., Smith T., Fostier A., and Guiguen Y., 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 290,558–566.
- Govoroun M.S., Pannetier M., Pailhoux E., Cocquet J., Brillard J.P., Couty I., Batellier F., and Cotinot C., 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* 231, 859–870.
- Green, B. W. and Teichert-Coddington D. R., 2000. Human food safety and environmental assessment of the use of 17 $\alpha$ -methyltestosterone to produce male tilapia in the United States. *J. World Aquac. Soc.* 31, 337–357.

- Grossen C., Neuenschwander S., and Perrin N., 2010. Temperature-dependent turnovers in sex-determination mechanisms: a quantitative model. *Evolution* 65-1, 64-78.
- Guan, G., Kobayashi, T., and Nagahama, Y., 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 662–6.
- Guerrero R.D. III. and Guerrero L.A., 1988. Feasibility of commercial production of sex-reversed Nile tilapia fingerlings in the Philippines. In: Pullin RSV, Bhukaswan T, Tonguthai K & Maclean JL (eds.) *Proceedings of the 2nd International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and ICLARM, Manila, Philippines. ICLARM Conf. Proc. 15, 183–186.
- Guerrero R.D., 1982. Control of tilapia reproduction. In “The biology and culture of Tilapias”. (R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-Mc Connel, eds) pp. 309-316. ICLARM, Manilla, Philippines.
- Guiguen Y., Baroiller J.F., Ricordel M.J., Iseki K., Mcmeel O.M., Martin S.A., and Fostier A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154–162.
- Guiguen Y., Fostier A., Piferrer F., and Chang C.-F., 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 352–366.
- Guo Y., Cheng H., Huang X., Gao S., Yu H., and Zhou R., 2005. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 950–957.

## H

- Halm S., Rocha A., Miura T., Prat F., and Zanuy S., 2007. Anti-Mullerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene* 388,148–58.
- Hatano O., Takayama K., Imai T., Waterman M.R., Takakusu A., Omura T., and Morohashi K.-I., 1994. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120, 2787–97.

- Hattori R.S., Murai Y., Oura M., Masuda S., Majhi S.K., Sakamoto T., Fernandino J.I., Somoza G.M., Yokota M., and Strüssmann C.A., 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 2955–2959.
- Hattori R.S., Fernandino J.I., Kishii A., Kimura H., Kinno T., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A., and Watanabe S., 2009. Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One* 4, e6548.
- Haw F., Bergman P.K., Fralick R.D., Buckley R.M. and Blankenship H.L., 1990. Visible implanted fish tag. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7, 311-315.
- Hawkins M., Thornton J., Crews D., Skipper J., Dotte A., and Thomas P., 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10751–10756.
- Helm W.T. and Tyus H.M., 1992. Influence of coating type on retention of dummy transmitters implanted in rainbow trout. *N. Am. J. Fish. Manage.* 12, 257-259.
- Herbinger C.M., Doyle R.W., Pitman E.R., Paquet D., Mesa K.A., Morris D.B., Wright J.M. and Cook D., 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137, 245-256.
- Heule C., Salzburger W., and Böhne A., 2014. Genetics of Sexual Development: An Evolutionary Playground for Fish. *Genetics*, Vol. 196, 579–591.
- Hickling C. F., 1960. The Malacca tilapia hybrids. *J. Genet.* 57, 1-10.
- Hines G., Boots L. R., Wibbels T., and Watts S. A., 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 235-248.
- Hiraki T., Takeuchi A., Tsumaki T., Zempo B., Kanda S., Oka Y., Nagahama Y., and Okubo K., 2012. Female-specific target sites for both oestrogen and androgen in the teleost brain. *Pro. R. Soc. B* 279, 5014-5023.
- Hiramatsu N., Matsubara T., Fujita T., Sullivan C.V., and Hara A., 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Mar. Biol.* 149, 35–47.



- Hong Y., Winkler C., and Scharl M., 1996. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* 60, 33–44.
- Hornung M.W., Jensen K.M., Korte J.J., Kahl M.D., Durhan E.J., Denny J.S., Henry T.R., and Ankley G.T., 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone: conversion of 17 $\alpha$ -methyltestosterone to 17 $\alpha$ -methylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 66, 15–23.
- Huertas M., Almeida O.G., Canário A.V.M., and Hubbard P.C., 2014. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 196, 106–111.
- Huet M., 1972. Cultivation of tilapias and other African cichlids, in text book of fish culture – Breeding and cultivation of fish, Fishing News (Books) L. T. D. West Byfleet: pp. 192–199.
- Huffman L. S., O’Connell L. A., and Hofmann H. A., 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiology & Behavior* 112–113, 77–83.
- Hunter G. A. and Donaldson E. M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. IX, Reproduction, Part B, Behavior and Fertility Control, Academic Press, New York, pp. 223–303.

## I

- Ijiri S., Kaneko H., Kobayashi T., Wang D.S., Sakai F., Paul-Prasanth B., Nakamura M., and Nagahama Y., 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* 78, 333–341.
- Ikegami T., Takeuchi Y., Hur S.-P., and Takemura A., 2014. Impacts of moonlight on fish reproduction. *Marine Genomics* In Press.

## J

- Jalabert B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 261–279.

- Jalabert B., Kammacher P., and Lessent P., 1971. Déterminisme du sexe chez les hybrides entre *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*. Etude de la sex-ratio dans les recroisements des hybrides de première génération par les espèces parentales. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 11, 155-165.
- Jalabert B., Moreau J., Planquette P., and Billard R., 1974. Déterminisme du sexe chez le *Tilapia nilotica*. Action de la méthyltestostérone dans l'alimentation des alevins sur la différenciation sexuelle ; proportion des sexes dans la descendance des mâles « inversés ». *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14, 4b, pp. 729-739.
- Jefferts K.B., Bergman P.K. and Fiscus H.F., 1963. A coded wire identification system for macro-organisms. *Nature* 198, 460-462.
- Jeng S.-R., Pasquier J., Yueh W.-S., Chen G.-R., Lee Y.-H., Dufour S., and Chang C.-F., 2012. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain–pituitary–ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 163-172.
- Jepsen N., Koed A., Thorstad E. and Baras E., 2002. Surgical implantation of transmitters in fish: how much have we learned ? *Hydrobiologia* 483, 239-248.
- Jordaan M. S., 2004. Variation in sex determination and the application of the yy male technology for the production of all-male populations of the *Tilapia Oreochromis mossambicus*. M.Sc, University of Stellenbosch. South Africa 81 pp.
- Josso N., Lamarre I., Picard J.Y., Berta P., Davies N., Morichon N., et al. 1993. Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum. Dev.* 33, 91-99.
- Josso N., Rey R.A., and Picard J.Y., 2013. Anti-Müllerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist. *Int. J. Endocrinol.* 674105.

## K

- Kaemingk M.A., Weber M.J., McKenna P.R. and Brown M.L., 2011. Effect of passive integrated transponder tag implantation site on tag retention, growth, and survival of two sizes of juvenile bluegills and yellow perch. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 31,726-732.
- Kah O., Anglade I., Linard B., Pakdel F., Salbert G., Bailhache T., Ducouret B., Saligaut C., Le Goff P., Valotaire Y., and Jégo P., 1997. Estrogen receptors in the brain-pituitary

- complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 53-62.
- Kallivretaki E., Eggen R.I.L., Neuhauss S.C.F., Kah O., and Segner H., 2007. The zebrafish, brain-specific, aromatase *cyp19a2* is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. *Dev. Dyn.* 236, 3155–3166.
- Karube M., Fernandino J.I., Strobl-Mazzulla P., Strüssmann C.A., Yoshizaki G., Somoza G.M., and Patino R., 2007. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome p-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Gen. Physiol.* 308A, 625–636.
- Kime D.E., 1979. The effect of temperature on the testicular steroidogenic enzymes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39, 290–296.
- Kime D. E. and Heyder M., 1983. The effect of temperature and gonadotropin on testicular steroidogenesis in *Sarotherodon* (Tilapia) *mossambicus* in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 105–115.
- Kitano T., Hayashi Y., Shiraishi E., and Kamei Y., 2012. Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to corticoid or high temperature. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 719–726.
- Kitano T., Yoshinaga N., Shiraishi E., Koyanagi T., and Abe S., 2007. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Mullerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1171–1177.
- Kitano T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y., and Abe S.I., 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23, 167–176.
- Kitano T., Takamune K., Nagahama Y., and Abe S.I., 2000. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 56, 1–5.
- Kobayashi H. and Iwamatsu T., 2005. Sex reversal in the medaka *Oryzias latipes* by brief exposure of early embryos to estradiol-17 $\beta$ . *Zool. Sci.* 22, 1163–1167.

- Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., and Nagahama Y., 2003. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenet. Genome Res* 101, 289–294.
- Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., Guan G., and Nagahama Y., 2008. Sexual Dimorphic Expression of DMRT1 and Sox9a During Gonadal Differentiation and Hormone-Induced Sex Reversal in the Teleost Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn.* 237, 297-306.
- Kobayashi T., Matsuda M., Kajiura-Kobayashi H., Suzuki A., Saito N., Nakamoto M., Shibata N., and Nagahama Y., 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* 231, 518–526.
- Kobayashi T. and Nagahama Y., 2009. Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. *Sex Dev.* 3, 108–117.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., and Nagahama, Y., 2008. Sexual Dimorphic Expression of DMRT1 and Sox9a During Gonadal Differentiation and Hormone-Induced Sex Reversal in the Teleost Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn.* 237, 297-306.
- Kobayashi T. and Nagahama Y., 2009. Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. *Sex. Dev.* 3, 108–117.
- Komen J. and Thorgard G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, 269, 150–173.
- Krejszeff S., Zarski D., Palinska-Zarska K., Trabska I., Kupren K., Targonska K., Bowszys M., and Kucharczyk D., 2013. Procedure for harmless estimation of fish larvae weight. *Ital. J. Sci.*, 12(e44), 270-273.
- Kwon J.Y., Haghpanah V., Kogson-Hurtado L.M., McAndrew B.J., and Penman D.J., 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.* 287, 46–53.
- Kwon J.Y., McAndrew B.J., Penman D.J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 359–70.

## L

- Lacroix G.L., Knox D., and McCurdy P., 2004. Effects of implanted dummy acoustic transmitters on juvenile Atlantic salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 133, 211-220.
- Lamba V.J., Goswami S.V., and Sundararaj B.I., 1983. Circannual and Circadian Variations in Plasma Levels of Steroids (Cortisol, Estradiol-17p, Estrone, and Testosterone) Correlated with the Annual Gonadal Cycle in the Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 205-225.
- Lazard J., 1980. Transfert de poisons et développement de la production piscicole. Exemple de 3 pays d'Afrique Subsaharienne. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 23, 251-265.
- Lebrun C., Billard R., Jalabert B., Escaffre A.M., and Cauty C., 2002. Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 405 – 412.
- Leveque C. and Paugy D., 1984. Guide des poissons d'eau douce de la zone du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. ORSTOM-OMS, 381p.
- Lewis Z.R., McClellan M.C., Postlethwait J.H., Cresko W.A., and Kaplan R.H., 2008. Female-specific increase in primordial germ cells marks sex differentiation in three-spine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Morphol.* 269, 909-921.
- Lim L. C. and Wong C.C., 1996. Fry production of freshwater ornamental fish in Singapore. In: LeRoy, R. (Ed.), *World Aquaculture '96 Book of Abstracts*, Bangkok, Thailand, p. 228 (Abstr.).
- Little D. C., Bhujel R.C., and Pham T. A., 2003. Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. *Aquaculture* 221, 265-276.
- Liu Z., Wu F., Jiao B., Zhang X., Hu C., Huang B., Zhou L., Huang X., Wang Z., Zhang Y., Nagahama Y., Cheng C.H., and Wang D., 2007. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J. Endocrinol.* 194, 223–241.
- Loffler K.A., Zarkower D., and Koopman P., 2003. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144, 3237– 3243.

- Lowe-Mc Connel R. H., 1982. Tilapias in Fish communities. In “The Biology and Culture of Tilapias” (R.S.V. Pullin et R. H. Lowe-Mc Connel, eds.), ICLARM, Manila, Philippines, p83-113.
- Lozano C.A., Gjerde B., Ødegard J., and Bentsen H.B., 2013. Heritability estimates for male proportion in the GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 372-375, 137-148.
- Lubzens E., Young G., Bobe J., and Cerdà J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367-389.
- Lucas M. C. and Baras E., 2000. Methods for studying spatial behaviour of freshwater fishes in the natural environment. *Fish and Fisheries* 1, 283-316.
- Lynch J.P., Lala D.S., Peluso J.J., Luo W., Parker K.L., and White B.A., 1993. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* 776–786.

## M

- Macintosh D. J. and Little D. C., 1995. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pages 277-320 in N. R. Bromage and R. J. Roberts, editors. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Institute of Aquaculture/Blackwell Science, United Kingdom.
- Macqueen D.J., Kristjánsson B.K., Paxton C.G.M., Vieira V.L.A., and Johnston I.A., 2011. The parallel evolution of dwarfism in Arctic charr is accompanied by adaptive divergence in mTOR-pathway gene expression. *Mol. Ecol.* 20, 3167–3184.
- Mair G.C., Abucay J.S., Skibinski D.O.F., Abella T.A., and Beardmore J.A., 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 396–404.
- Mair G.C., Penman D.J., Scott A.G., Skibinski D.O.F., and Beardmore J.A., 1987. Hormonal sex reversal and the mechanisms of sex determination in *Oreochromis spp.* In: Tiews K. (Ed.), *Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture Vol 2.*, Bordeaux, France, pp. 289-300.
- Mair G.C., Abucay J.S., Beardmore J.A., and Skibinski D.O.F., 1995. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY males in *Oreochromis niloticus* L.: on station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* 137, 313-322.

- Mandiki S.N.M., Babiak I., Bopopi J.M., Leprieur F., and Kestemont P., 2005. Effects of sex steroids and their inhibitors on endocrine parameters and gender growth differences in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles. *Steroids* 70, 85-94.
- Marchand O., Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Bernot A., Laudet V., and Guiguen Y., 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 180–187.
- Marty G.D. and Summerfelt R.C., 1986. Pathways and mechanisms for expulsion of surgically implanted dummy transmitters from channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 577-589.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., et al., 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.
- Matsuda Y., Nishida-Umehara C., Tarui H., Kuroiwa A., Yamada K., Isobe T., Ando J., Fujiwara A., Hirao Y., Nishimura O., Ishijima J., Hayashi A., Saito T., Murakami T., Murakami Y., Kuratani S., and Agata K., 2005. Highly conserved linkage homology between birds and turtles: birds and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Res.* 13, 601-615.
- Mc Bay L. G., 1961. The biology of *Tilapia nilotica* (Linneaus). *Pro. Ann. Conf. South-East Assoc. Game Fish Comm.* 15, 208-218.
- McCarthy M.M. and Arnold A.P., 2011. Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat. Neurosci.* 14, 677– 683.
- Mélard C. and Philippart J.C., 1981. La production de *Tilapia* de consommation dans les rejets industriels de l'eau de chaude en Belgique. *Cahiers d'Ethologie appliquée*, 1, p 7-122.
- Mélard C., 1995. Production of a high percentage of male offspring with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. *Aquaculture* 130, 25–34.
- Mélard C., Ducarme C., and Lasserre J., 1989. Technologie de l'élevage intensif du tilapia reproduction-croissance-nutrition-production-pathologie-aspects économiques. Editeurs (laboratoire de démographie des poissons et de pisciculture, CERER-Pisciculture). Tihange, Belgique.



- Menuet A., Pellegrini E., Anglade I., Blaise O., Laudet V., Kah O., and Pakdel F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66, 1881–1892.
- Miranda A., Almeida O.G., Hubbard P.C., Barata E.N., and Canario A.V., 2005. Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Exp. Biol.* 208, 2037–2043.
- Mires D., 1977. Theoretical and practical aspects of the production of all-male Tilapia hybrids. *Bamidgeh* 29,94-101.
- Miura T., Miura C., Konda Y., Yamauchi K., 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129, 2689-2697.
- Molés G., Gómez A., Rocha A., Carrillo A., and Zanuy S., 2008. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 68–76.
- Montserrat N., González A., Méndez E., Piferrer F., and Planas J.V., 2004. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 $\beta$  production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 123–131.
- Moreau M., Arrufat P., Latil G., and Jeanson R., 2011. Use of radio-tagging to map spatial organization and social interactions in insects. *J. Exp. Biol.* 214, 17-21.
- Mruck H., Wessels S., and Hörstgen-Schwark G., 2013. Growth at temperature-treated phenotypic, hormone-treated phenotypic and genetic males of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a commercial recirculation system. Pages 160-161 in *Abstracts of the 10th International Symposium on Tilapia in Aquaculture (ISTA)*, Israeli Aquaculture and Marine Biotechnology, Jerusalem, Israel.
- Münsterberg A. and Lovell-Badge R., 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, 113, p 613–624.
- Myers J.M., Penman D.J., Basavaraju Y., Powell S.F., Baoprassertkul P., Rana K.J., Bromage N., and McAndrew B.M., 1995. Induction of diploid androgenetic and mitotic

gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L). Theoretical and Applied Genetics 90, 205–210.

Mylonas C.C. and Zohar Y., 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. Aquaculture 202, 205–220.

Mylonas C.C., Fostier A., and Zanuy S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 516–534.

Mylonas C.C., Kyriakou G., Sigelaki I., Georgiou G., Stephanou D., and Divanach P., 2004a. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRHa. Isr. J. Aquacult.-Bamid. 56, 75–92.

Mylonas C.C., Papandroulakis N., Smboukis A., Papadaki M., and Divanach P., 2004b. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. Aquaculture 237, 141–154.

## N

Nagahama Y. and Yamashita M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Develop. Growth Differ. 50, S195–S219.

Nagahama Y., 1987. 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one – a teleost maturation inducing hormone. Dev. Growth Differ. 29, 1–12.

Nagahama Y., 1997. 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. Steroids 62, 190–196.

Nagahama Y., Yoshikuni M., Yamashita M., Tokumoto T., Kasu Y., 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. Curr. Top. Dev. Biol. 30, 103–145.

Nagler J.J., Davis T.L., Modi N., Vijayan M.M., and Schultz I., 2010. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Gen. Comp. Endocrinol. 167, 326–330.

Nakamoto M., Matsuda M., Wang D.S., Nagahama Y., and Shibata N., 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 344, 353–361.

Nakamoto M., Wang D.S., Suzuki A., Matsuda M., Nagahama Y., and Shibata N., 2007. Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. Mol. Reprod. Dev. 74, 1239–1246.

- Nakamura M., 2010. The Mechanism of Sex Determination in Vertebrates-Are Sex Steroids the Key-Factor? J. Exp. Zool. 313A, 381-398.
- Nakamura M., 2013. Morphological and Physiological Studies on Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. Aqua-BioSci. Monogr. 6, 1-47.
- Nakamura M., Bhandari R.K., and Higa M., 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. Fish Physiol. Biochem. 28, 113–117.
- Nakamura M., Kobayashi T., Chang X.-T., and Nagahama Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. J. Exp. Zool. 281, 362-372.
- Nakamura S., Watakabe I., Nishimura T., Picard J.-Y., Toyoda A., Taniguchi Y., di Clemente N., and Tanaka M., 2012. Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti- Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. Development 139, 2283-2287.
- Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., et al., 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 11778–11783.
- Navarro A., Oliva V., Zamorano M.J., Ginés R., Izquierdo M.S., Astorga N., and Afonso J.M., 2006. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): Effects on growth, mortality and tag loss. Aquaculture 257, 309-315.
- Navarro-Martin L., Viñas J., Ribas L., Díaz N., Gutiérrez A., Di Croce L., and Piferrer F., 2011. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (*cyp19a*) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. PLoS Genet. 7(12), e1002447. doi:10.1371/journal.pgen.1002447.
- Nelson E.R. and Habibi H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. Gen. Comp. Endocrinol. 192, 15-24.
- Nielsen L.A., 1992. Methods of Marking Fish and Shellfish. American Fisheries Society Special Publication 23, Bethesda, MD.
- Nugent B.M. and McCarthy M.M., 2011. Epigenetic underpinnings of developmental sex differences in the brain. Neuroendocrinol 93, 150-158.

- Okumura S., Okamoto K., Oomori R., Sato H., and Nakazono A., 2003. Improved fertilization rates by using a large volume spawning tank in red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiol. Biochem.* 28, 515–516.
- Olito C. and Brock I., 1991. Sexual reversal of rainbow trout creating an all-female population. *Prog. Fish Cult.* 53, 41-44.
- Oliveira R.F., 2009. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioural plasticity and social competence. *Integrative and Comparative Biology* 49, 423-440.
- Orban L., Sreenivasan R., and Olsson P.E., 2009. Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 35–41.
- Ospina-Alvarez, N., and Piferrer F., 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE* 3 (7), e2837.
- Ouedraogo C., Baroiller J.F., Pepey E., Canonne M., and D'Cotta H., 2014. Brain masculinisation shows different *cyp19a1b* and *amh* expression profiles between genetic XY males, 17 $\alpha$ - ethyltestosterone, temperature and fadrozole-induced XX males of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* In press.
- Ouedraogo C., Canonne M., D'Cotta H., Baras E., and Baroiller J.F., 2014. Growth and survival of XX Nile tilapia masculinised with elevated temperature, 17 $\alpha$ -methyltestosterone and fadrozole in comparison to XX females and XY males. *N. Am. J. Aquacult.*, In press.
- Ouedraogo C., Canonne M., D'Cotta H., Baroiller J.F., and Baras E., 2014, Minimal body size for tagging fish with electronic microchips : a study in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *N. Am. J. Aquacult.*, 76:3, 275-280.
- Ouedraogo C., de Verdal H., Canonne M., D'Cotta H., Baroiller J.F., and Baras E., 2013. Minimal body sizes for tagging with small electronic tags and individually identified young Nile tilapia by image analysis and microsatellite genotyping: a matter of individual growth, tag ratio or intrinsic size-dependent sensitivity to surgery? In : Israeli Aquaculture and Marine Biotechnology (Eds.) Abstracts of the 10th International Symposium on Tilapia in Aquaculture (ISTA), Jerusalem, pp 84-85.

- Ouedraogo C., Canonne M., Pepey E., Baroiller J.F., and D'Cotta H., 2014. Different masculinising treatments of XX tilapia all induce the increase of *dmrt1* and *amh* to suppress the ovarian pathway. *Gen. Comp. Endocrinol.* In press.
- Ovidio M., Desprez D., Mélard C., and Poncin P., 2002. Influence of sexual genotype on the behaviour of females (genotype WZ) and pseudofemales (genotype ZZ) in the tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquat. Living Resour.* 15, 163-167.
- Owusu-Frimpong M., 1987. Breeding behaviour pattern of the lake fish *Tilapia discolor* Gunter (Teleostei, Cichlidae) in captivity. *J. Fish Biol.* 30, 1-5.

## P

- Pandian T.J. and Varadaraj K., 1987. Techniques to regulate sex ratio and breeding in tilapia. *Current Science* 56, 337-343.
- Pankhurst N.W., 2008. Gonadal steroids: functions and patterns of change. In: Rocha, M.J., Arukwe, A., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Reproduction*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 67–111.
- Pankhurst N.W., Thomas P.M., 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture* 166, 163–177.
- Papah M.B., Kisia S.M., Ojoo R.O., Makanya A.N., Wood C.M., Kavembe G.D., Maina J.N., Johannsson O.E., Bergman H.L., Laurent P., Chevalier C., Bianchini A., Bianchini L.F., and Onyango D.W., 2013. Morphological evaluation of spermatogenesis in Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*): A fish living on the edge. *Tissue and Cell*, 45, 371–382.
- Paris M., Pettersson K., Schubert M., Bertrand S., Pongratz I., Escriva H., and Laudet V., 2008. An amphioxus orthologue of the estrogen receptor that does not bind estradiol: insight into estrogen receptor evolution. *BMC Evol. Biol.* 8, 219.
- Patil J.G. and Gunasekera R.M., 2008. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*): implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158(1), 131-137.
- Paul-Prasanth B., Bhandari R.K., Kobayashi T., Horiguchi R., Kobayashi Y., Nakamoto M., Shibata Y., Sakai F., Nakamura M., and Nagahama Y., 2013. Estrogen oversees the

- maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. Scientific Reports. 3, p 2045-2322. DOI : 10.1038/srep02862
- Philippart J.C. and Ruwet J.C., 1982. Ecology and distribution of Tilapias. In “the biology and culture of Tilapias”. (R.S.V. Pullin, and Lowe-Mc Connell, eds), ICLARM, Manille, Philippines. pp.15-59.
- Piek E., Heldin C.H., and Ten Dijke P., 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J.* 13, 2105–2124.
- Piferrer F. and Blazquez M., 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31, 215–226.
- Piferrer F. and Guiguen Y., 2008. Fish gonadogenesis. Part 2. Molecular biology and genomics of fish sex differentiation. *Rev. Fish. Sci.* 16, 33–53.
- Poonlaphdecha S., Pepey E., Canonne M., de Verdal H., Baroiller J. F., and D’Cotta H., 2013. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 234-242.
- Poonlaphdecha S., Pepey E., Huang S.-H., Canonne M., Soler L., Mortaji S., Morand S., Pfennig F., Mélard C., Baroiller J.F., and D’Cotta H., 2011. Elevated *amh* Gene Expression in the Brain of Male Tilapia (*Oreochromis niloticus*) during Testis Differentiation. *Sex. Dev.* 5, 33-47.
- Prentice E.F., Flagg T.A., and McCutcheon C.S., 1990. Feasibility of using implantable passive integrated transponder (PIT) tags in salmonids. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7, 317–322.
- Pruginin Y., Rothbard S., Wolfarth G., Halevy A., Moav R., and Hulata G., 1975. All male broods of *Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea* hybrids. *Aquaculture* 6, 11–21.

## Q

- Quinn A.E., Georges A., Sarre S., Guarino F., Ezaz T., and Marshall Graves J.A., 2007. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* 316, 411.
- Quinn A.E., Radder R.S., Sarre S.D., Georges A., Ezaz T., and Shine R., 2009. Isolation and development of a molecular sex marker for *Bassiana duperreyi*, a lizard with XX/XY sex chromosomes and temperature-induced sex reversal. *Mol. Genet. Genomics* 281, 665–672.

## R

- Radder R.S., Quinn A.E., Georges A., Sarre S.D., and Shine R., 2008. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol. Letts.* 4, 176–178.
- Randall C.F. and Bromage N.R., 1998. Photoperiodic history determines the reproductive response of rainbow trout to changes in daylength. *Comp. Physiol.* 183, 651–661.
- Rasheeda M.K., Sridevi P., and Senthilkumaran B., 2010. Cytochrome P450 aromatases: impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 234–245.
- Rashid H., Kitano H., Lee K.H., Nii S., Shigematsu T., Kadomura K., Yamaguchi A., and Matsuyama M., 2007. Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sex Dev.* 1, 311–322.
- Reindl K.M. and Sheridan M.A., 2012. Peripheral regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 231–245.
- Reinecke M. and Collet C., 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int. Rev. Cytol.* 183, 1–94.
- Reinecke M., Björnsson B.T., Dickhoff W.W., McCormick S.D., Navarro I., Power D.M., and Gutierrez J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 20–24.
- Rhen T., Metzger K., Schroeder A., and Woodward R., 2007. Expression of Putative Sex-Determining Genes during the Thermosensitive Period of Gonad Development in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. *Dev. Sex.* 1, 255–270. DOI: 10.1159/000104775.
- Rodríguez-Marí A., Yan Y. L., Bremiller R. A., Wilson C., Canestro C., and Postlethwait J. H., 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a* during gonad development. *Gene Expr. Patterns* 5, 655–667.
- Rosenfeld H., Meiri I., and Elizur A., 2007. Gonadotropin regulation of oocyte development. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to*



Biotechnological Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 171–198.

Rougeot C., Krim A., Mandiki S.N., Kestemont P., and Mélard C., 2007. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology* 67(5), 1046-52.

Rougeot C., Prignon C., Ngouana Kengne C.V., and Mélard C., 2008. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 276, 205–208.

Roussel J.M., Haro A., and Cunjak R. A., 2000. Field test of a new method for tracking small fishes in shallow rivers using passive integrated transponder (PIT) technology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1326–1329.

Ruwet J.C., Voss J., Hanon L., and Micha J.C., 1976. Biologie et écologie du Tilapia. In « Symposium on aquaculture in Africa » ; FAO/CIFA Tech. Pap. 4 (Suppl. 1) pp. 332-364.

## S

Sarre S.D., Georges A., and Quinn A., 2004. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26, 639–645.

Sawaguchi S., Kagawa H., Ohkubo N., Hiramatsu K., Sullivan C.V., and Matsubara M., 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 719–736.

Schleicher G., Drews U., Stumpf W.E., and Sat M., 1984. Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. *Histochemistry* 81, 139-147.

Schulz R.W., Bogerd J., Male R., Ball J., Fenske M., Olsen L.C., Tyler C.R., 2007. Estrogeninduced alterations in *amh* and *dmrt1* expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6305–6310.

Scott A.G., Penman D.J., Beardmore J.A., and Skibinski D.O.F., 1989. The YY Supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in Aquaculture. *Aquaculture*, 78, 237-251.

- Scott A.P., Liley N.R., and Vermeirssen E.L.M., 1994. Urine of reproductively mature female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), contains a priming pheromone which enhances plasma levels of sex steroids and Gonadotropin-II in males. J. Fish Biol. 44, 131–147.
- Senthilkumaran B., Yoshikuni M., and Nagahama Y., 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 215, 11–18.
- Shanthanagouda A. H., Patil J. G., and Nugegoda D., 2012. Ontogenic and sexually dimorphic expression of cyp19 isoforms in the rainbow fish, *Melanotaenia fluviatilis* (Castelnau 1878). Comp. Biochem. Physiol. A 161, 250–258.
- Shelton W.L., Hopkins K.D., and Jensen G.L., 1978. Use of hormones to produced monosex Tilapia for aquaculture. In: Smitherman R.O., Shelton W.L., Grover S.H. (Eds.), Culture of Exotic Fishes Symposium Proceedings. Fish Culture Section. Am. Fish. Soc., Auburn, Texas. pp. 10–33.
- Shelton W.L., Hopkins K.D., and Jensen G.L., 1978. Use of hormones to produced monosex Tilapia for aquaculture. Pages 10-33 in R. O. Smitherman, W. L. Shelton and S. H. Grover, editors. Culture of Exotic Fishes Symposium Proceedings. Fish Culture Section. American Fisheries Society, Auburn, Texas.
- Shen W-H., Moore C.C.D., Ikeda Y., Parker K.L., and Ingraham H.A., 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates MIS gene expression: a link to the sex determination cascade. Cell 77, 651–61.
- Shen X., Yang G., Liu Y., Liao M., Wang X., Zhu M., Song W., Zou G., Wei Q., Wang D., and Chen D., 2007. Construction of genetic linkage maps of guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers. Aquaculture 271, 178-187.
- Shimizu T., Ohshima I., Ozawa M., Takahashi S., Tajima A., Shiota M., Miyazaki H., and Kanai Y., 2005. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. Reproduction 129, 463-472.
- Shine R., Elphick M.J., and Donnellan S., 2002. Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. Ecol. Lett. 5, 486–489.

- Shoemaker B.A, Portman J.J., and Wolynes P.G., 2000. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: The fly-casting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, pp. 8868-8873.
- Shoemaker C.A., Klesius P. H., and Evans J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 62, 174-177.
- Shoemaker C.M. and Crews D., 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20, 293–303.
- Shved N., Berishvili G., Baroiller J.F., Segner H., Eppler E., Reinecke M., 2007. Ethinylestradiol differentially interferes with the IGF-I system in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Endocrinol.* 195, 513–23.
- Shved N., Berishvili G., Baroiller J.F., Segner H., and Reinecke M., 2008. Environmentally relevant concentrations of 17 alpha-ethinylestradiol (EE2) interfere with the growth hormone (GH)/insulin-like growth factor (IGF)-I system in developing bony fish. *Toxicol. Sci.* 106, 93–102.
- Shved N., Berishvili G., Häusermann E., D’Cotta H., Baroiller J.F, and Eppler E., 2009. Challenge with 17a-ethinylestradiol (EE2) during early development persistently impairs growth, differentiation, and local expression of IGF-I and IGF-II in immune organs of tilapia. *Fish & Shellfish immunol.* 26, 524-530.
- Singh A.K., 2013. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 146-155.
- Singh R., Singh A.K., and Tripathi M., 2012. Effect of a non steroidal tamoxifen on the gonad and sex differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Environ. Biol.* 33, 799-803.
- Skalski J.R., Buchanan R.A. and Griswold J., 2009. Review of marking methods and release-recapture designs for estimating the survival of very small fish: examples from the assessment of salmonid fry survival. *Rev. Fish. Sci.*, 17, 391-401.
- Smith C.A., Smith M.J., and Sinclair A.H., 1999. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234, 395–402.

- Specker J.L. and Sullivan C.V., 1994. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives. In K. G. Davey, R. E. Peter, and S. S. Tobe (Eds.), "Perspectives in Comparative Endocrinology," pp. 304 – 315. Natl. Res. Council, Ottawa.
- Stacey N. and Sorensen P., 2005. Reproductive pheromones. In: Sloman, K.A., Wilson, R.W., Balshine, S. (Eds.), Behaviour and Physiology of Fish. Academic Press, Amsterdam, pp. 359–412.
- Stacey N., 2011. Chapter 9 – hormonally derived sex pheromones in fishes. In: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), Hormones and Reproduction of Vertebrates. Academic Press, London, pp. 169–192.
- Stacey N.E., Sorensen P.W., Van Der Kraak G.J., and Dulka J.G., 1989. Direct evidence that 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. Gen. Comp. Endocrinol. 75, 62–70.
- Strobl-Mazzula P.H., Lethimonier C., Gueguen M.M., Karube M., Fernandino J.I., Yoshizaki G., Patiño R., Strüssmann C.A., Kah O., and Somoza G.M., 2008. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: Neuroanatomical and functional relations. Gen. Comp. Endocrinol. 158, 191-201.
- Strussmann C.A. and Nakamura M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem. 26, 13-29.
- Sudhakumari C.C., Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., Wang D.S., Yoshikuni M., Nagahama Y., and Senthilkumaran B., 2005. Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. Fish Physiol. Biochem. 31,129-135.
- Sudhakumari C.C., Senthilkumaran B., Kobayashi T., Wang D.S., Chang X.T., and Nagahama Y., 2003. Expression of cytochrome P-450aromatases in the sex-reversed Nile tilapia. Fish Physiol. Biochem. 28, 177–178.

## T

- Tacon P., Baroiller J.F., Le Bail P.Y., Prunet P., and Jalabert B., 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. Gen. Comp. Endocrinol. 117, 54-65.
- Tacon P., Ndiaye P., Cauty C., LeMenn F., and Jalabert B., 1996. Relationships between the expression of maternal behaviour and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 146, 261-275.
- Takahashi H. and Shimizu M., 1983. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 34, 69–78.
- Takahashi H., 1977. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 28, 57–65.
- Takamatsu N., Kanda H., Ito M., Yamashita A., Yamashita S., and Shiba T., 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. Gene 202, 167-170.
- Taranger G.L., Carrillo M., Schulz R.W., Fontaine P., Zanuy S., Felip A., Weltzien F-A., Dufour S., Karlsen Ø., Norberg B., Andersson E., and Hansen T., 2010. Control of puberty in farmed fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 483-515.
- Tatara C.P., 2009. Size at implantation affects growth of juvenile steelhead implanted with 12-mm passive integrated transponders. N. Am. J. Fish. Manage., 29:417-422.
- Tchoudakova A. and Callard G.V., 1998. Identification of multiple CYP 19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology 139, 2179–2189.
- Tessema M., Müller-Belecke A., Hörstgen-Schwark G., 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. Aquaculture 258, 270–277.
- Thomas P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. Gen. Comp. Endocrinol. 175, 367-383.
- Thoreau X., and Baras E., 1997. Evaluation of the surgery procedures for implanting telemetry transmitters into the body cavity of blue tilapia *Oreochromis aureus*. Aquat. Living Resour. 10, 207-211.

- Todo T., Ikeuchi T., Kobayashi T., and Nagahama Y., 1999. Fish androgen receptors: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected mammalian cells, and tissue Mrna levels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254, 378-383.
- Toguyeni A., 1996. La croissance différentielle liée au sexe chez le tilapia (Pisces: Cichlidae), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Contribution des facteurs génétiques, nutritionnels, comportementaux et recherche d'un relais endocrinien. Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure .pp. 158.
- Toguyeni A., Fauconneau B., Boujard T., Fostier A., Kuhn E. R., Mol K. A., and Baroiller J. F., 1997. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus* : effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. *Physiol. Behav.* 62 (2), 273-279.
- Toguyeni A., Fauconneau B., Fostier A., Abucay J., Mair G.C., and Baroiller J.F., 2002. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex-ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 207, 249–261.
- Toguyéni A., Fauconneau B., Mélard C., Fostier A., Lazard J., Baras E., Kühn E.R., van der Geyten S., and Baroiller J.F., 2009. Sexual dimorphism in two pure cichlid species, *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus 1758) and *Sarotherodon melanotheron melanotheron* Rüppel 1852, and their intergeneric hybrids. *Afr. J. Aquat. Sci.* 34, 69-75.
- Trewavas E., 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum Natural History, London, UK. 583pp.
- Tsadik G.G. and Bart A.N., 2007. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 272, 380-388.
- Tsai C.L., Chang S.L., Wang L.H., and Chao T.Y., 2003. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. *J. Neuroendocrinol.* 15, 97–102.
- Tyler J.R. and Sumpter J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6, 287–318.

Tzchori I., Zak T., and Sachs O., 2004. Masculinization of genetic females of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by dietary administration of an aromatase inhibitor. *Bamidgeh* 56:239-246.

## V

Van Den Hurk R., Lambert J.G.D., and Peute J., 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 413-425.

Van Den Hurk R. and Van Oordt P.G.W.J., 1985. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57, 216-222.

van Ginneken V.J.T. and Maes G.E., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 367–398.

Varadaraj K., Sindhu Kumari S., and Pandian T. J., 1994. Comparison of conditions hormonal sex reversal of Mozambique Tilapia. *Progressive Fish-culturist* 56, 81-90.

Venken K., Callewaert F., Boonen S., and Vanderschueren D., 2008. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int.* 19, 1517-1525.

Vera Cruz E.M. and Mair G.C., 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L). *Aquaculture* 122, 237–248.

Vermeirssen E.L.M., Scott A.P., Mylonas C.C., and Zohar Y., 1998. Gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17,20b-dihydroxylated and 5b-reduced, 3a-hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 163–177.

Vermeirssen E.L.M., Shields R.J., Mazorra de Quero C., and Scott A.P., 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 77–87.

Vigier B., Forest M.G., Eychenne B., Bézard J., Garrigou O., Robel P., and Josso N., 1989. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3684–3688.



- Vinas J. and Piferrer F., 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol. Reprod.* 79, 738–747.
- Visser J.A., Olaso R., Verhoef-Post M., Kramer P., Themmen A.P.N., and Ingraham H.A., 2001. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian-inhibiting substance signaling. *Mol. Endocrinol.* 15 (6), 936–945.
- Vissier J.A., 2003. AMH signaling: from receptor to target gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 65–73.
- Vizziano D., Baron D., Randuineau G., Mahe S., Cauty C., and Guiguen Y., 2008. Rainbow Trout Gonadal Masculinization Induced by Inhibition of Estrogen Synthesis Is More Physiological Than Masculinization Induced by Androgen Supplementation. *Biol. Reprod.* 78, 939–946.
- Vizziano D., Randuineau G., Baron D., Cauty C., and Guiguen Y., 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn.* 236, 2198–2206.
- Vizziano-Cantonnet D., Anglade I., Pellegrini E., Gueguen M-M., Fostier A., Guiguen Y., and Kah O., 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 346–355.
- Vizziano D., Baron D., Randuineau G., Mahè S., Cauty C., and Guiguen Y., 2008. Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biol. Reprod.* 78, 939–946.
- von Hofsten J., Larsson A., and Olsson P.E., 2005. Novel steroidogenic factor-1 homolog (ff1d) is coexpressed with anti-Müllerian hormone (AMH) in Zebrafish. *Dev. Dyn.* 233, 595–604.

## W

- Wagner G.N. and Cooke S.J., 2005. Methodological approaches and opinions of researchers involved in the surgical implantation of telemetry transmitters in fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 17, 160–169.

- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., Keutel J., Hustert E., Wolf U., Tommerup N., Schempp W., and Scherer G., 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111-1120.
- Wagner G.N. and Cooke S.J., 2005. Methodological approaches and opinions of researchers involved in the surgical implantation of telemetry transmitters in fish. *J. Aquat. Anim. Health* 17, 160-169.
- Wang D.S., Kobayashi T., Zhou L.Y., and Nagahama Y., 2004. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 83–89.
- Wang D.S., Kobayashi T., Zhou L.Y., Paul-Prasanth B., Ijiri S., Sakai F., Okubo K., Morohashi K., and Nagahama Y., 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21, 712–725.
- Wang D.S., Zhou L.Y., Kobayashi T., Matsuda M., Shibata Y., Sakai F., Nagahama Y., 2010. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology* 151, 1331–1340.
- Wang L.H. and Tsai C.L., 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Zool.* 2856, 534–537.
- Wang P.Y., Protheroe A., Clarkson A.N., Imhoff F., Koishi K., and McLennan I.S., 2009. Müllerian inhibiting substance contributes to sex-linked biases in the brain and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 7203–7208.
- Wang D.S., Kobayashi T., Zhou L.Y., Paul-Prasanth B., Ijiri S., Sakai F., Okubo K., Morohashi K., and Nagahama Y., 2007. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21, 712–725.
- Warner D.A. and Shine R., 2008. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature (London)* DOI: 10.1038/nature06519.

- Wessels S. and Hörstgen-Schwark G., 2011. Temperature dependent sex ratios in selected lines and crosses with a YY-male in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 318, 79–84.
- Wessels S. and Hörstgen-Schwark G., 2007. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 272, S80–S87.
- Wilson C.A. and Davies D.C., 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133, p 331–359.
- Winkler S.M. and Wade J., 1998. Aromatase Activity and Regulation of Sexual Behaviors in the Green Anole Lizard. *Physiol. Behav.* 64, 723-731.
- Winter J.D., 1983. Underwater biotelemetry. pp. 371-395. In: L.A. Nielsen, D.L. Johnson (eds.). *Fisheries Techniques*. Am. Fish. Soc., Bethesda, Maryland. 468 pp.
- Wittmann W., McLennan I.S., 2013. The bed nucleus of the stria terminalis has developmental and adult forms in mice, with the male bias in the developmental form being dependent on testicular AMH. *Hormones and Behavior* 64:605-610.
- Wohlfarth G.W., 1994. The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 781-788.
- Wohlfarth G.W., Hulata G., and Halevy A., 1990. Survival, sex ratio and growth of some tilapia species and their interspecific hybrids. *Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ.* 11,87-1001.
- Wohlfarth G.W. and Hulata G., 1983. *Applied Genetics of Tilapias*. ICLARM Studies and Review 6; Manila, Philippines. 26 pp.
- Wokoma K. and Marioghae I.E., 1996. Survival of *Tilapia guineensis* under conditions of low dissolved oxygen and low pH. P.442-448. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J. B. Amon Kothias and D. Pauly (eds.) *The third International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. ICLARM Conf. Proc. 41, 575 p.
- Wrobel K.H., 2003. The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: the müllerian duct. *Anat. Embryol.* 206, 255-271.

Xu D.-H., Shoemaker C.A., Klesius P.H., 2007. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J. Fish Diseases 30, 233-238.

## Y

Yamaguchi T., Yamaguchi S., Hirai T., and Kitano T., 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 359, 935-940.

Yamamoto T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.), Fish Physiology, vol. III, Reproduction, Academic Press, New York, pp. 117-175.

Yamamoto Y., Luckenbach J.A., Goetz F.W., Young G., and Swanson P., 2011. Disruption of the salmon reproductive endocrine axis through prolonged nutritional stress: Changes in circulating hormone levels and transcripts for ovarian genes involved in steroidogenesis and apoptosis. Gen. Comp. Endocrinol. 172, 331-343.

Yao H.C. and Capel B., 2005. Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. J. Biochem. 138, 5–12.

Yokoi H., Kobayashi T., Tanaka M., Nagahama Y., Wakamatsu Y., Takeda H., Araki K., Morohashi K., and Ozato K., 2002. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. Mol. Reprod. Dev. 63, 5–16.

Yoshinaga N., Shiraishi E., Yamamoto T., Iguchi T., Abe S., and Kitano T., 2004. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322, 508–513.

Yoshiura Y., Senthilkumaran B., Watanabe M., Oba Y., Kobayashi T., Nagahama Y., 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. Biol. Reprod. 68, 1545–155.

## Z

- Zapater C., Chauvigné F., Scott A.P., Gómez A., Katsiadaki I., and Cerdà J., 2012. Piscine follicle-stimulating hormone triggers progestin production in gilthead seabream primary ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 87 (111), 111–113.
- Zhang W-L., Zhou L-Y., Senthilkumaran B., Huang B-F., Sudhakumari C.C., Kobayashi T., Nagahama Y., and Wang D-S., 2010. Molecular cloning of two isoforms of 11b-hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 34-41.

## **RESUME**

La production de tilapias et surtout celle du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) connaît depuis 30 ans, une impressionnante croissance liée à ses nombreux atouts pour l'aquaculture. Toutefois, le contrôle du sexe conditionne la rentabilité de cette filière. En effet chez le tilapia du Nil le mâle présente une meilleure croissance que la femelle. Depuis les années 70, la production de populations monosexes mâles de tilapia du Nil est pratiquée dans la quasi-totalité des fermes aquacoles afin de bénéficier de la meilleure croissance des mâles par rapport aux femelles et de contrôler la reproduction précoce et continue chez cette espèce. Actuellement, l'inversion hormonale du sexe par la 17 $\alpha$ -methyltestostérone (17MT) constitue la technique la plus utilisée pour produire les cohortes monosexes mâles. Toutefois, l'utilisation des hormones pour la production de poissons marchands soulève de nombreuses questions relevant de la sécurité alimentaire comme de la protection des travailleurs piscicoles et de l'environnement. D'autres approches sont donc recherchées. Elles reposent sur des approches génétiques, ou sur les effets masculinisants des fortes températures ou enfin sur l'utilisation d'anti-aromatase. Dans cette thèse, nous avons comparé les effets de trois traitements, utilisant respectivement la 17MT, le fadrozole (un inhibiteur de l'aromatase) et les fortes températures, sur des caractères d'intérêt zootechniques (survie, croissance) et sur l'expression de gènes clés de la différenciation du sexe dans les gonades et dans le cerveau des mâles induits (mâles 17MT, mâles anti-aromatase et thermo-néomâles). Parallèlement les mêmes analyses ont été menées sur des mâles et des femelles génétiques. Les fortes températures produisent des mâles dont la croissance est similaire à celle des mâles génétiques, confortant l'idée que les traitements thermiques pourraient constituer une alternative écologique aux utilisations des hormones pour la production de populations monosexes mâles chez le tilapia, sous réserve de sélectionner des souches à forte thermosensibilité. Le rôle positif des androgènes et/ou l'effet inhibiteur des œstrogènes sur la croissance est discuté. L'analyse des profils d'expression de gènes clés de la différenciation sexuelle suggère des régulations différentes dans le cerveau et dans les gonades. En particulier, l'*amh* et *cyp19a1b* sont très fortement stimulées dans le cerveau des mâles traités par la température ; inversement l'*amh* est inhibée dans le cerveau des individus traités par le fadrozole, suggérant une régulation directe ou indirecte de l'*amh* par l'aromatase. Dans les gonades des mâles induits, les niveaux de *dmrt1* et *amh* sont surexprimés par rapport à ce qui est observé chez les mâles génétiques. Ce travail mériterait d'être complété par a) des études sur la fertilité des mâles induits b) des dosages des taux circulants de stéroïdes et de protéines dans le plasma c) des analyses histologiques ou immunohistochimiques du cerveau et des gonades et d) l'étude de l'expression d'autres gènes.

**Mots-clés :** Tilapia du Nil / Masculinisation / Température / Hormones / Croissance / Gènes

---

## **Comparative, Physiological and molecular analyses of the effects of three masculinising treatments of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, and search for markers of these approaches.**

### **SUMMARY**

Due to the genuine advantages of this species (fast growth, spontaneous breeding in captivity), the aquaculture production of tilapias, and especially of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), has been growing steadily over the past 30 years. Nevertheless, the success of this production is largely dependent on the sex control efficiency, in order to take advantage of the better growth of males and to avoid uncontrolled breeding that can cause crowding and dwarfism. The use of male monosex populations has thus become a standard in tilapia aquaculture since the 1970s. The dietary administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (17MT) is still the major masculinising procedure used in tilapia farming nowadays. However, it raises issues concerning the environment, fish farmers and consumers' health. More recently, alternatives to hormonal sex reversal have been evaluated, i.e. the use of YY males, treatment using aromatase inhibitors or elevated temperatures during the early life stages. In the present study, the effects of fadrozole (an aromatase inhibitor), elevated temperatures and 17MT have been compared on the survival and growth of XX fish, and as regards to the expression patterns in the brain and gonads of key genes implicated in fish sex differentiation. Comparisons seen in these induced-males were performed with genetic XX females and XY males. The growth rates of fish raised at elevated temperature were similar to those of genetic males, thereby emphasizing the relevance of this method as an alternative to hormonal sex reversal of Nile tilapia, when using highly thermosensitive strains. Whether the growth of tilapia is stimulated by androgens or depressed by estrogens is discussed. The analysis of expression profiles of the genes involved in sexual differentiation reveals different patterns in the brain and in the gonads. *Amh* and *cyp19a1b* are strongly stimulated in the brain of XX neomales treated by elevated temperatures. Conversely, *amh* is inhibited in the brain of fish treated with fadrozole, suggesting that *amh* is directed or indirectly regulated by aromatase. In the gonads of XX neomales, the levels of *dmrt1* and *amh* are much higher than in genetic XY males. Further studies should analyse a) the fertility of neomales, b) the plasmatic levels of steroids and proteins, c) the histology and immunohistochemistry of the brain and the gonads, and d) the expression of other genes.

**Key words :** Nile tilapia / Masculinisation / Temperature / Hormones / Growth / Genes

**Discipline :** Ecosystèmes et sciences agronomiques

### **Adresse du laboratoire :**

CIRAD Montpellier, UMR 110 INTREPID (INTensification Raisonnée et Ecologique pour une Pisciculture Durable

TAB-110/A Campus International de Baillarguet

34398 Montpellier cedex 5 France